

**Verfahren zum schnellen und empfindlichen
Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin
in Lebensmitteln am Modell des Enterotoxin B
nach dem ELISA-Prinzip**

Elisabeth Simon

1978

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan)
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Verfahren zum schnellen und empfindlichen Nachweis
von Staphylokokken-Enterotoxin in Lebensmitteln
am Modell des Enterotoxin B nach dem ELISA-Prinzip

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München



von
Elisabeth Simon
aus
Wesseloh

München 1978

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Professor Dr. H. KräuBlich

Referent: Professor Dr. G. Terplan

Korreferent: Professor Dr. H. Karg

Tag der Promotion: 28. Juli 1978



Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., 8135 Söcking/Starnberg

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Schrifttum	3
2.1 Staphylokokken-Enterotoxine (SE)	3
2.1.1 Charakterisierung der Staphylokokken-Enterotoxine	3
2.1.1.1 Allgemeines	3
2.1.1.2 Eigenschaften von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)	3
2.1.2 Zum Vorkommen der Staphylokokken-Enterotoxine in Lebensmitteln	7
2.1.3 Zum empfindlichen Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxine in Lebensmitteln	10
2.2 ELISA-Prinzip	12
2.2.1 Allgemeines	12
2.2.2 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen mittels Enzymimmunmethoden	12
3. Eigene Untersuchungen	14
3.1 Herstellung eines Enzym-Enterotoxin-Konjugates	14
3.1.1 Material	
3.1.2 Methodik	16
3.1.2.1 Untersuchung verschiedener Substrate auf Eignung zur Aktivitätsbestimmung der Peroxidase	16
3.1.2.2 Standardisierung von Peroxidase und Enterotoxin	22
3.1.2.3 Kopplung von Peroxidase an Enterotoxin	26
3.1.2.4 Überprüfung des Kopplungserfolges und Gewinnung des Enzym-Enterotoxin-Konjugates	27
3.2 Ergebnisse	28
3.3 Herstellung des Immunosorbens	34
3.3.1 Material	34
3.3.2 Methodik	35
3.3.2.1 Aufbereitung und Standardisierung des Enterotoxin B-Antiserums	35
3.3.2.2 Einflüsse von Antiserum-Konzentration, Inkubationsart, Inkubationszeit und Lösungsmittel auf die Bindung des Immunglobulins an Polystyrenröhrchen	35

3.4	Ergebnisse	37
3.5	Anwendung des ELISA an Enterotoxin B-Standards	39
3.5.1	Material	39
3.5.2	Methodik	
3.5.2.1	Einfluß verschiedener Reaktionszeiten und Inkubationsarten auf den Test	40
3.5.2.2	Untersuchungen zur Spezifität des Testes	43
3.5.2.3	Untersuchungen zur Abstimmung der Reaktionspartner des Testsystems	44
3.6	Ergebnisse	
3.7	Anwendung des ELISA zum Nachweis von Enterotoxin B in Lebensmittelextrakten	49
3.7.1	Material	
3.7.2	Methodik	
3.7.2.1	Herstellung von Lebensmittelextrakten	
3.7.2.2	Nachweis von Enterotoxin B in Lebensmittelextrakten	52
3.8	Ergebnisse	52
4.	Diskussion	56
5.	Zusammenfassung	69
6.	Literaturverzeichnis	73

Abkürzungen

SE	Staphylokokken-Enterotoxin(e)
SEA	Staphylokokken-Enterotoxin A
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SEC	Staphylokokken-Enterotoxin C
SED	Staphylokokken-Enterotoxin D
SEE	Staphylokokken-Enterotoxin E
POD	Peroxidase
RZ	Reinheitsszahl
5 AS	5-Amino-2-hydroxybenzoesäure (Aminosalicylsäure)
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-äthyl-benzthiazolin-6-sulfon- säure) · (NH ₄) ₂ -salz
BSA	Bovines Serumalbumin
PBS	Phosphate Buffered Saline
BHI	Brain Heart Infusion
RNA	Ribonucleic Acid
Fc	Fragment (crystallizable)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung

Die registrierte Zunahme der durch Staphylokokken-Enterotoxin bedingten Lebensmittelintoxikationen ist teils auf verbesserte diagnostische Möglichkeiten, teils auf Änderungen in den Ernährungsgewohnheiten, speziell auf eine Zunahme der Gemeinschaftsverpflegung zurückzuführen. Die klinischen Erscheinungen dieser Erkrankung vermitteln dem Erfahrenen schon frühzeitig Hinweise auf die Ätiologie, dagegen ist erst aufgrund des Enterotoxinnachweises die endgültige Diagnose möglich. Auch etwaige spektakuläre Fortschritte in der ohnehin schon hochentwickelten serologischen Diagnostik werden kaum Entscheidungshilfen für den behandelnden Arzt bieten können, da bis zur Erkennung möglicher ursächlicher Zusammenhänge, der damit veranlaßten Entnahme von Proben verschiedener Art (Lebensmittel, Patientenmaterial) und dem Eingang des Untersuchungsmaterials häufig so viel Zeit vergeht, daß sich die Erkrankten - nach subjektiv als äußerst bedrohend empfundenen Stunden - schon wieder im Zustand abklingender Krankheitserscheinungen befinden dürften. Dennoch besteht speziell im Hinblick auf die Verhinderung von Leiden, aber auch auf die mit der Krankheit verbundenen wirtschaftlichen Schäden die Notwendigkeit, die Diagnostik der Staphylokokken-Enterotoxikosen zu verbessern, wozu der Tierarzt als Sachwalter der in diesem Zusammenhang wichtigen Lebensmittel tierischen Ursprungs ebenfalls aufgerufen ist.

Die Diagnose einzelner Staphylokokken-Enterotoxikosen erweitert unsere Erkenntnisse über die Entstehung dieser Erkrankung und damit über die Möglichkeiten der Prophylaxe. Die Untersuchungen der verdächtigen Lebensmittelproben beschränken sich bisher meist auf den Nachweis von potentiell toxinogenen Staphylokokken und deren Stoffwechselprodukte Koagulase und hitzestabile DNase, weil den Routinelabors die kostspieligen Antigene und Antiseren selten zur Verfügung stehen und die erforderliche Erfahrung vor allem für die dem sero-

logischen Nachweis vorausgehenden Extraktionsverfahren fehlt. Dieser Untersuchungsgang ist insofern problematisch, als einerseits die Isolierung toxinogener Staphylokokken in geringer Anzahl und auch der Nachweis der genannten Stoffwechselprodukte Koagulase oder hitzestabile DNase nicht sichere Indikatoren für die Anwesenheit von Enterotoxin sind, andererseits ein negativer Nachweis von Staphylococcus aureus oder hitzestabiler DNase die Anwesenheit von Enterotoxin nicht ausschließt. Der Beweis einer Enterotoxikose kann daher - abgesehen vom Affenfütterungsversuch - nur über den spezifischen serologischen Toxinnachweis erbracht werden, der bisher allerdings langwierige und aufwendige Extraktionen voraussetzt.

Kurze Nachweiszeiten sind zwar aus therapeutischen Gründen nicht zwingend, sie ermöglichen jedoch in Verbindung mit hoher Empfindlichkeit nicht nur rasche Erkennung toxinhaltiger Lebensmittel, sondern sind auch aufgrund des geringeren Personal- und Materialaufwandes wirtschaftlicher. Der Radioimmun-Test hat diese Anforderung erfüllt, abgesehen davon, daß eine teure Laborausrüstung und besondere Sicherheitsvorkehrungen erforderlich sind. Daher wurde nach vergleichbaren zuverlässigen und ausreichend empfindlichen Enterotoxinnachweismethoden, die auch für Routineverfahren geeignet sind, gesucht. Bis zu Beginn dieser Arbeit wurde lediglich in einer Publikation (71), allerdings ohne Detailangaben, über einen Test berichtet, der mit enzymmarkiertem Antikörper (ELA) zum Nachweis von gereinigtem Enterotoxin A angewandt wurde und der den vorher erwähnten Anforderungen entsprechen könnte.

Die eigene Arbeit war von der Vorstellung ausgegangen, ein Nachweisverfahren nach kompetitivem Prinzip zu entwickeln, das sich an dem auf anderen Gebieten der Serologie bereits eingeführten ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) orientiert. Falls sich dieses Prinzip beim Nachweis von reinem Enterotoxin als geeignet erweisen sollte, war der Nachweis von Toxin in Lebensmittelextrakten vorgesehen, zumal die Hoffnung bestand, bei der hohen Empfindlichkeit dieses Prinzips auf die bisherigen aufwendigen Extraktions-, Reinigungs- und Konzentrierungsverfahren verzichten oder sie zumindest erheblich einschränken zu können.

2. Schrifttum

2.1 Staphylokokken-Enterotoxin (SE)

2.1.1 Charakterisierung der Staphylokokken-Enterotoxine

2.1.1.1 Allgemeines

Staphylokokken-Enterotoxine (SE) sind wasserlösliche, hauptsächlich von Koagulase-positiven, seltener von Koagulase-negativen Staphylokokkenstämmen produzierte (7, 8) Proteine mit Molekulargewichten von 27.800 bis 34.100 (60). Aufgrund ihrer Eiweißnatur sind diese Toxine in der Lage, spezifische Antikörperbildung im Organismus zu induzieren, wodurch sich die einzelnen SE-Typen serologisch differenzieren lassen. Entsprechend einer Übereinkunft (21) werden die bisher bekannten sechs SE-Typen (5, 10, 13, 14, 19, 22) in alphabetischer Reihenfolge mit den Buchstaben A - F benannt. Es besteht Grund zur Annahme, daß noch weitere SE-Typen existieren, zumal im Affenfütterungstest (80) positive *Staphylococcus aureus*-Stämme gefunden wurden, die sich nicht mit bekannten Antienterotoxinen charakterisieren ließen (9, 11). Die SE rufen bei oraler Aufnahme im allgemeinen nach einer Inkubationszeit von einer bis sechs Stunden schlagartig auftretende (32) typische Symptome wie Erbrechen und Durchfall (7, 8) hervor, die je nach Konstitution der betroffenen Personen teilweise noch mit Kreislaufstörungen und deren Folgeerscheinungen einhergehen können. Eine Erholung der Patienten tritt meist nach 24 bis 72 Stunden wieder ein (1, 7, 8, 32).

2.1.1.2 Eigenschaften von Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB)

Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) wurde bisher häufig für grundlegende Untersuchungen auf dem Gebiet der SE herangezogen, denn dieser Toxintyp kann im Labor in relativ hohen Konzentrationen produziert werden (8, 27, 69). Die Reindarstellung erfolgte erstmals von BERGDOLL, SUGIYAMA und DACK (12) und HIBNICK und BERGDOLL (49). Später hat sich die von SCHANTZ et al. (75) empfohlene Methode zur Produktion und Reinigung durchgesetzt, welche auch Grundlage zur Herstellung und Reinigung von SEB in dieser Arbeit war.

SEB besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit relativ hohem Gehalt an Lysin, Apsaraginsäure, Glutaminsäure und Tyrosin (15) und weist ein Molekulargewicht von 28.366 (51) auf. Es besteht aus 239 Aminosäureresten (51, 52, 53) mit einem Stickstoffgehalt von 16,1% (15); es hat seinen isoelektrischen Punkt bei pH 8,6 und zeigt ein Absorptionsmaximum bei 277 nm. Zur Bestimmung des SEB-Proteins wird ein Extinktionskoeffizient ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) von 14,4 zugrunde gelegt. Im SEB-Molekül konnten keine freien Sulfhydrylgruppen nachgewiesen werden. Die endständige Aminosäure ist am N-Terminal als Glutaminsäure und am C-Terminal als Lysin identifiziert worden (15). Unter den verschiedenen SE-Typen gelang bis heute lediglich die völlige Aufklärung der Aminosäuresequenz vom SEB-Molekül (51).

Aminosäuresequenz von SEB (HUANG und BERGDOLL, 1970)

NH ₂ -Glu-Ser-Gln-Pro-Asp-Pro-Lys-Pro-Asp-Glu-Leu-His-Lys-Ser-Ser-Lys-Phe-Thr-Gly-	10
Leu-Met-Glu-Asn-Met-Lys-Val-Leu-Tyr-Asn-Asn-Asp-His-Val-Ser-Ala-Ile-Asn-Val-Lys-	20
Ser-Ile-Asn-Glu-Phe-Phe-Asp-Leu-Ile-Tyr-Leu-Tyr-Ser-Ile-Lys-Asp-Thr-Lys-Leu-Gly-	30
Asn-Tyr-Asp-Asn-Val-Arg-Val-Glu-Phe-Lys-Asn-Lys-Asp-Leu-Ala-Asp-Lys-Tyr-Lys-Asp-	40
Lys-Tyr-Val-Asp-Val-Phe-Gyl-Ala-Asn-Tyr-Tyr-Gln-Cys-Tyr-Phe-Ser-Lys-Lys-Thr-Asn-	50
Asn-Ile-Asp-Ser-His-Glu-Asn-Thr-Lys-Arg-Lys-Thr-Cys-Met-Tyr-Gly-Gly-Val-Thr-Glu-	60
His-Gly-Asn-Asn-Gln-Leu-Asp-Lys-Tyr-Tyr-Arg-Ser-Ile-Thr-Val-Arg-Val-Phe-Glu-Asp-	70
Gly-Lys-Asn-Leu-Leu-Ser-Phe-Asp-Val-Gln-Thr-Asn-Lys-Lys-Lys-Val-Thr-Ala-Glu-Gln-	80
Leu-Asp-Tyr-Leu-Thr-Arg-His-Tyr-Leu-Val-Lys-Asn-Lys-Lys-Leu-Tyr-Glu-Phe-Asn-Asn-	90
Ser-Pro-Tyr-Glu-Thr-Gly-Tyr-Ile-Lys-Phe-Ile-Glu-Asn-Glu-Asn-Ser-Phe-Typ-Tyr-Asp-	100
Met-Met-Pro-Ala-Pro-Gly-Asn-Lys-Phe-Asp-Gln-Ser-Lys-Tyr-Leu-Met-Met-Tyr-Asn-Asn-	110
Asp-Lys-Met-Val-Asp-Ser-Lys-Asp-Val-Lys-Ile-Glu-Val-Tyr-Leu-Thr-Thr-Lys-Lys-	120
Lys(COOH)	130
	140
	150
	160
	170
	180
	190
	200
	210
	220
	230

Zuvor waren schon eine Reihe von chemischen Modifikationen vorgenommen und physikalische Methoden herangezogen worden, um einerseits die Struktur des Moleküls zu analysieren und zum anderen auch die biologischen und

Dieses Aufbrechen der Cystin-Schleife mit Trypsin konnte auch bei SEC durchgeführt werden, bei SEA jedoch nicht. Da weiterhin eine gewisse Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zwischen SEB und SEC zu bestehen scheint, nimmt man an (11), daß diese beiden SE-Typen in ihrer Struktur sehr ähnlich sein müssen. Weiterhin wurde festgestellt (79), daß nach Trypsinierung sowohl das Peptid des N-Terminals als auch das des C-Terminals noch mit dem spezifischen Antikörper reagierten. Das Peptid des C-Terminals bildete mit dem spezifischen Anti-SEB allerdings kein Präzipitat.

BERGDOLL und ROBBINS (9) konnten Kreuzreaktionen zwischen SEB und SEC feststellen, die nicht auf einer Präzipitation basierten und vermuteten, daß die für die Kreuzreaktion zuständige Region beider Toxinmoleküle mit der zuvor beschriebenen antigenen Region des Peptids des C-Terminals vom SEB identisch sein könnten.

Weitere Kreuzreaktionen zwischen spezifischem SEB-Antiserum und anderen SE-Typen in Präzipitationstests sind nicht beschrieben worden.

Schwierigkeiten bei der Beurteilung experimenteller Daten können zuweilen aus der Heterogenität des SEB erwachsen. Bei der Fraktionierung über Ionenaustauscher-Chromatographie wurden drei Fraktionen mit gleicher Antigen-Antikörper-Reaktion erhalten (6); das gleiche Bild zeigte sich bei der Chromatographie mittels Hydroxylapatit-Chromatographie (26). Durch isoelektrische Fokussierung (25) ließen sich sogar vier verschiedene Komponenten mit verschiedenen isoelektrischen Punkten trennen, die immunologisch wiederum völlig gleich reagierten. Aufgrund vergleichender Untersuchungen (9 , 54) an anderen SE-Typen wird davon ausgegangen, daß der Hauptanteil der antigenen Komponente des SEB in der Nähe der Molekülposition 92, der Hauptanteil der toxischen Komponente aber in der Nähe der Position 112 lokalisiert ist.

Die Wirkung auf den Menschen durch diesen Enterotoxintyp (32) wurde in Freiwilligenversuchen in jedem Fall mit 0,14 µg/kg Körpergewicht

ausgelöst. Bei jedem dritter betrug die emetische Dosis nur 0,05 µg/kg Körpergewicht. Es wird diskutiert (28), daß die emetische Aktivität des SEB-Moleküls möglicherweise auf die vorhandenen Methioninreste zurückzuführen ist, da durch Alkylierung von mehr als sechs dieser Aminosäurereste keine Emesis mehr durch das modifizierte Toxin erreichbar war.

2.1.2 Zum Vorkommen der Staphylokokken-Enterotoxine in Lebensmitteln

Wie aus nachstehenden Statistiken der Jahre 1975 und 1976 des Center for Disease Control, Atlanta (23,24) hervorgeht, nehmen die durch *Staphylococcus aureus* bzw. durch dessen Enterotoxine hervorgerufenen Lebensmittelvergiftungen (Lebensmittelvergiftungen umfassen im Sinne dieser Arbeit alle bakteriologisch bedingten, durch Lebensmittelverzehr verursachten Erkrankungen, wobei es sich teils um echte Vergiftungen (Staphylokokken-Enterotoxikose), teils um Infektionen oder Toxininfektionen (Salmonellose) handelt) neben denen durch Salmonellen bedingten Vergiftungen einen breiten Raum ein.

Häufigkeit der Lebensmittelvergiftungen in den USA

	durch Staphylokokken bzw. deren Enterotoxine		durch Salmonellen	
	1975	1976	1975	1976
Einzel- erkrankungen	4067 (55,1%)	930 (26%)	1573 (21,3%)	1169 (32,7%)
Gruppen- erkrankungen	45 (23,6%)	26 (19,7%)	38 (19,9%)	28 (21,2%)

Wenn man in dieser Statistik die durch Staphylokokken und die durch Salmonellen bedingten Einzelerkrankungen miteinander vergleicht, zeigen sich in der Verteilung im Jahr 1975 besonders große Unterschiede. Beim Vergleich der Gruppenerkrankungen (outbreaks) besteht dagegen

nahezu gleiche Verteilung zwischen diesen beiden, ätiologisch wichtigsten Bakteriengattungen. Die prozentualen Angaben der Gruppenerkrankungen werden der epidemiologischen Situation eher gerecht als die Zahlen der Einzelerkrankungen.

Während 1975 von der zuvor genannten Institution bei der Untersuchung verdächtiger Lebensmittel lediglich SEA gefunden wurde und meist Schinken mit diesem Toxintyp kontaminiert war, ergaben die Untersuchungen von 1976 ein ganz anderes Bild. Es waren diesmal nämlich Lebensmittelarten wie Makkaroni, Spaghetti, Geflügelsalate, Ei-Milch-Zubereitungen und gebackene Bohnen kontaminiert. In diesen Lebensmitteln konnten folgende Toxintypen bzw. Typ-Kombinationen gefunden werden:

SE-Typ	Häufigkeit des Vorkommens in SE-positiven Lebensmitteln
SEA	20,0%
SED	57,6%
SEA, SEB und SED	6,2%
SEA und SED	6,2%

Eine andere Möglichkeit zur hygienischen Beurteilung besteht in der Untersuchung von Lebensmitteln auf enterotoxinogene Staphylokokken, obgleich die Anwesenheit solcher Keime kein Beweis für die Kontamination des Lebensmittels mit SE ist. Aus umfangreichen Untersuchungen von Lebensmitteln auf Enterotoxinbildner (19) geht hervor, daß hauptsächlich SEA-Bildner vorhanden waren. Im einzelnen wurden 49% der isolierten Stämme als SEA-Bildner, 7,6% als SED-Bildner, 25% als SEA- und SED-Bildner, und 3,8% als SEB-Bildner und 2,5% als SEC-Bildner identifiziert. Obgleich am häufigsten SEA aus Lebensmitteln isoliert werden konnte und dieser SE-Typ allgemein als der wichtigste, Lebensmittelintoxikationen verursachende benannt wird (10, 13, 19, 20, 34, 82, 83), scheint dem zu widersprechen, daß beispielsweise die o.a.

Statistik für die Ursache von Lebensmittelvergiftungen durch SE am häufigsten den Typ D ausweist. Auch in institutsinternen Untersuchungen von Lebensmitteln (unveröffentlicht), die Vergiftungen bei einem großen Personenkreis hervorgerufen hatten, wurden neben SEA gleichermaßen häufig SEC und SEE isoliert.

Nach vergleichendem Literaturstudium im Rahmen einer Dissertation (59) scheint eine gewisse Beziehung zwischen Enterotoxinogenität der Staphylokokken und deren Herkunft zu bestehen. Danach war der Anteil an SE-Bildnern unter Stämmen humanen Ursprungs deutlich höher als bei jenen, die aus boviner Milch bzw. Mastitissekret isoliert worden waren. Inwieweit aber die Häufigkeit bestimmter SE-Typen in Lebensmitteln durch die Provenienz enterotoxinogener Staphylokokken, die Art des Lebensmittels oder gar durch noch unbekannte Faktoren beeinflusst wird, ist aufgrund der Literatur noch nicht zu beantworten.

Über die Bedeutung von Staphylokokken und deren Stoffwechselprodukte in Lebensmitteln haben zuletzt umfassend unter Berücksichtigung der einschlägigen Literatur MINOR und MARTH (60) berichtet. Diese Autoren vertreten u.a. die Ansicht, daß durch Staphylokokken verursachte Lebensmittelintoxikationen vollständig verhindert werden können, wenn die Kontaminationsmöglichkeiten von Lebensmitteln entsprechend berücksichtigt werden und geeignete prophylaktische Maßnahmen ergriffen werden. Voraussetzung für eine Kontamination der Lebensmittel mit enterotoxinogenen Staphylokokken sind Reservoirs dieser Keime (Mensch, Tier, Gerätschaften), die unmittelbar mit Lebensmitteln in Berührung kommen. Für die anschließende Vermehrung der Keime und damit für die Toxinproduktion auf oder in dem Lebensmittel sind insbesondere Zeit und Temperatur maßgebend. Unter den prophylaktischen Maßnahmen seien nur die wichtigsten herausgestellt, die geeignet sein könnten, eine erfolgte Kontamination der Lebensmittel unter Kontrolle zu halten: Lagerung der Lebensmittel bei Temperaturen, die keine Staphylokokkenvermehrung erlauben (4°C), Ausnutzen der Wachstums- hemmung der Staphylokokken durch Anwesenheit anderer Keime (z.B. Säure-

wecker in Milchprodukten), Kontrolle von pH und verfügbarem Wasser in Lebensmitteln (pH im neutralen bzw. schwach alkalischen Bereich sowie hohe Wasseraktivität begünstigen Staphylokokkenwachstum) oder eventuell auch Gebrauch von wachstumshemmenden Chemikalien (Konservierungsstoffen).

2.1.3 Zum empfindlichen Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxine in Lebensmitteln

Da äußerst geringe SE-Mengen ($0,125 - 0,25 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ Lebensmittel (68) für den Menschen noch toxisch sein können, kommt es bei der Erkennung toxinhaltiger Lebensmittel besonders auf effektive Extraktionsmethoden und ausreichend empfindliche Nachweismethoden an.

Die zahlreichen, bis 1976 publizierten Extraktionsmethoden (46, 78) basieren auf chemischen und physikalischen Methoden, die zur Extraktion, Reinigung und Konzentrierung von SE einen relativ hohen Arbeits- und Materialaufwand erfordern. Im Anschluß an diese Verfahren, die hier nicht im einzelnen aufgezeigt werden sollen, erfolgt dann erst der serologische SE-Nachweis.

Diese SE-Isolierungsmethoden wurden um eine erweitert (48), die auf Affinitätschromatographie basiert und geeignet ist, noch $0,1 \mu\text{g}$ SEB aus 100 g künstlich kontaminierten Lebensmitteln zu isolieren. Im ersten Schritt dieser Methode werden spezifische SEB-Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt und anschließend wird damit eine Chromatographiesäule gepackt. Danach wird toxinhaltiger Lebensmittelaextrakt über diese Säule laufen gelassen, wobei nun vorhandenes SEB gebunden wird, indem es einen Immunkomplex mit dem spezifischen Antikörper bildet. Die übrigen Extraktbestandteile passieren die Säule. In einem weiteren Schritt wird das adsorbierte SEB mit einem geeigneten Puffer von dem homologen Antikörper gelöst und serologisch nachgewiesen. Zum serologischen Nachweis verwendeten die betreffenden Autoren den Microslide-Test und die Umgekehrte Passive Hämagglu-

tionation. Bei letzterer registrierten sie unspezifische Reaktionen, die sich nur durch hochspezifische Antiseren vermeiden lassen.

Aus Übersichtsarbeiten von 1975 (50, 78) wird deutlich, daß noch keine idealen Nachweismethoden (Extraktion eingeschlossen) für SE in Lebensmitteln mit genügender Sensitivität und Spezifität für den zeitsparenden Toxinnachweis gefunden werden konnten. Auch jüngste vergleichende Untersuchungen (62) zeigten, daß bei herkömmlichen Extraktionsmethoden erhebliche Mengen an Toxin verlorengehen können, so daß aufgrund der mangelhaften Toxin-Recovery aus Lebensmitteln, die krankmachende Mengen SE enthalten, mit einem negativen Toxin-nachweis gerechnet werden muß, wenn zum serologischen Nachweis die sonst sehr zuverlässigen Gelpräzipitationstests eingesetzt werden. Es ist an vielen Stellen daran gearbeitet worden, sowohl die Extraktionsmethoden als auch die serologischen Nachweismethoden ständig zu verbessern oder gar so empfindliche Nachweise zu entwickeln, bei denen auf umständliche Extraktionen der SE aus Lebensmitteln verzichtet werden kann.

Seit der Entwicklung eines Solid-Phase Radioimmunoassays zum Nachweis von SEB (30, 56) sind eine Reihe von Untersuchungen mit diesem Verfahren angestellt worden, auch SEA und SEC bzw. alle drei SE-Typen im Lebensmittel nachzuweisen (18, 31, 33, 55, 58, 65, 67). Es wurden auch Modifikationen beschrieben, den Radioimmunoassay in seiner Spezifität und Reproduzierbarkeit zu erhöhen (67), was teilweise mit erheblichem Zeitaufwand verbunden war. Dabei wurden beispielsweise zum Nachweis von 1 µg Enterotoxin/ml in Milch bzw. 1,3 µg/ml in Geflügelsalatextrakt 24 Stunden benötigt. Weitere Varianten des Radioimmunoassays zum SE-Nachweis stellen Verfahren (63, 87) dar, in denen einerseits SEC₂ mit einer Doppelantikörpertechnik und andererseits SEB in einem kombinierten Verfahren, das sowohl Affinitätschromatographie als auch die Radioimmuntechnik beinhaltet, nachgewiesen werden. Trotz dieser Vielfalt der radioimmunologischen SE-Diagnostik hat sich bis jetzt noch kein Verfahren herauskristallisiert, das sowohl zum Nachweis aller SE-Typen als auch zeit- und materialsparend für die Routine-diagnostik einsetzbar wäre.

2.2 ELISA-Prinzip

2.2.1 Allgemeines

Das ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)-Prinzip funktioniert ähnlich wie der schon länger bekannte Solid-Phase Radioimmunoassay und basiert auf dem Prinzip, daß enzymmarkiertes Antigen bzw. Antikörper mit dem nicht markierten Antigen bzw. Antikörper einer Probe um die Bindungsstellen des spezifischen Antikörpers oder Antigens konkurrieren. Seit ENGVALL und PERLMAN (35) dieses Prinzip in die serologische Routinediagnostik einführten, hat es eine beträchtliche Entwicklung zum ELISA gegeben. Eine Übersicht über die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Es sei aber auf ein umfassendes Werk (38) und eine Übersichtsarbeit (76) verwiesen, die einen fast vollständigen Überblick über die bisherige Anwendung des ELISA-Prinzips und seine Modifikationen geben.

2.2.2 Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen mittels Enzymimmunmethoden

Als erster berichtete SAUNDERS (71) über eine Doppelantikörper-technnik mit enzymmarkiertem Antikörper zum Nachweis von reinem SEA, ohne Details zu beschreiben, die es erlaubt hätten, diese Methode mit Erfolg nachzuvollziehen. Wie schon 1976 (81) berichtet, wurde am hiesigen Institut an einer Methode nach dem ELISA-Prinzip gearbeitet, bei der unter Verwendung eines mit Peroxidase markierten Enterotoxins SE einer Probe nachgewiesen werden sollte. Die ersten Ergebnisse mit diesem ELISA im Hinblick auf einen Toxinnachweis in Lebensmittelextrakten (77) zeigten, daß diese Methode sich auch in Zukunft als schnelle, sensitive, zeitsparende und quantitative Methode zum Enterotoxinnachweis in Lebensmitteln eignen könnte.

Durch persönliche Mitteilung wurde mir bekannt, daß etwa gleichzeitig ein ELISA zum SEB-Nachweis entwickelt worden war (39),

allerdings unter Verwendung einer anderen Kopplungsmethode (61) und mit alkalischer Phosphatase als Label. Diese Methode wurde dann später in einer Modifikation (42) zum Nachweis von SEB in Lebensmitteln in Form eines Petrischalen-Tests vorgestellt, der sich allerdings nach Meinung seiner Autoren (40, 41) nicht bewährt hat und inzwischen durch einen ELISA unter Verwendung von Polystyrenperlen als Sorbens ersetzt worden ist (41).

Der zuvor erwähnte indirekte Enzym-Immunassay zum Nachweis von SEA (71) ist inzwischen auch als Nachweismethode für SEA in Lebensmitteln beschrieben worden (73). Die Empfindlichkeit dieses Tests ist mit 0,4 ng/ml bzw. 3,2 ng/ml bei Testzeiten von 20 Stunden bzw. 1 - 3 Stunden angegeben worden. Es wird dabei weitgehend auf eine Lebensmittelextraktion verzichtet, was aber laut Autorenangabe bei Anwesenheit proteolytischer Enzyme zu Störungen des Tests geführt hat.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Herstellung eines Enzym-Enterotoxin-Konjugates

3.1.1 Material

Als Hauptsubstanzen des Konjugates wurden gereinigte Meerrettich-peroxidase (Worthington, Freehold, N.J./USA) mit einheitlichem Molekulargewicht von 40.000, Glutardialdehyd (nachfolgend immer Glutaraldehyd genannt) (Roth, Karlsruhe) reinst als 25%ige wäßrige Lösung und Staphylokokken-Enterotoxin B aus institutseigener Produktion verwendet.

Die aus Meerrettich hergestellte Peroxidase (POD) war wie folgt vom Hersteller charakterisiert worden:

Aktivität: 1030 units/mg Protein (spektrophotometrische Aktivitätsbestimmung mit H_2O_2 in einem Phenol/Aminoantipyrin gekoppelten System)

Proteinbestimmung: 64% Protein

mg/ml = $A_{275\text{nm}}/\text{cm/ml} \times 1,22$

Reinheit: RZ = 3,0.

Enterotoxin B (SEB) wurde aus dem Staphylococcus aureus-Stamm 243 (ATCC 14458) produziert, der von M.S. BERGDOLL (Food Research Institute, University of Wisconsin, Madison/USA) zur Verfügung gestellt wurde. Herstellung und Reinigung von SEB erfolgten nach einer von SCHANTZ et al. (75) beschriebenen Methode. Es wurde allerdings zusätzlich eine dritte Reinigungsstufe durch Chromatographie über Sephadex G-75 (40 - 120 μ) angeschlossen. Dazu wurde Sephadex G-75 mit 0,02 m Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, äquilibriert, eine Chromatographiesäule (3,5 x 100 cm) gepackt und das Eluat aus der zweiten Reinigungsstufe, das zuvor konzentriert worden war, aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Das Eluat aus der dritten Reinigungsstufe wurde sterilfiltriert, in Vakuum unter Rühren konzentriert, gegen Aqua dest. drei Tage bei 4°C dialysiert und dieses

Konzentrat anschließend zentrifugiert. Vom Überstand wurde danach der Toxingehalt serologisch (OUDIN-Test), der Salzgehalt durch Leitfähigkeitsmessung und die Reinheit durch Extinktionsmessungen bestimmt.

Menge des Überstandes:	18 ml	
Leitfähigkeit:	$3,2 \times 10^{-5}$ S	
E277 nm:	1,23	} 1:10 verdünnt
E280 nm:	1,17	
E260 nm:	0,58	

Faktorbestimmung nach SCHANTZ et al. (75):

$$\frac{260}{277} = 0,47$$

$$\frac{280}{260} = 2,02$$

Toxingehalt (OUDIN-Test): 6,5 mg/ml

Das gesamte Eluat wurde nun lyophilisiert (Delta IA, Christ, Osterode) und luftdicht verschlossen bei -18°C gelagert.

Weiterhin wurden folgende Substanzen verwendet: Sephadex G-25 coarse (100 - 300 μ) und Sephadex G-75 superfine (10 - 40 μ) (Deutsche Pharmacia, Freiburg).

Standardisiertes SEB-Referenztoxin (Serva, Heidelberg);

Eichproteine für die Gel-Chromatographie (Serva, Heidelberg):

Chymotrypsinogen A	MG = 25.000
Albumin aus Hühnerei	MG = 45.000
Albumin aus Rinderserum	MG = 67.000

Eichproteine für die SDS-Diskelektrophorese (Boehringer, Mannheim):

Trypsininhibitor aus Sojabohnen	MG = 21.500
Albumin aus Rinderserum	MG = 68.000
RNA-Polymerase von E. coli mit	MG = 165.000
drei Untereinheiten	MG = 155.000
	MG = 39.000

Chromogene für die Substratherstellung:

5-Amino-2-hydroxybenzoesäure (5 AS bzw. Aminosalicylsäure)

(Merck-Schuchardt, München)

2,2'-Azino-bis-(3-äthyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure). $(\text{NH}_4)_2$ -salz

(ABTS) (Serva, Heidelberg)

3,3-Dimethoxybenzidin(o-Dianisidin) (Serva, Heidelberg)

Guajacol (Sigma, München)

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Untersuchung verschiedener Substrate auf Eignung zur Aktivitätsbestimmung der Peroxidase

Im Hinblick auf die spätere Anwendung im ELISA ist die Aktivität der POD zweckmäßigerweise indirekt anhand eines definierten Substratumsatzes nach definierter Zeit durch Extinktionsmessung bestimmt worden.

Die Auswahl der Chromogene zur Substratherstellung wurde auf die in neuerer Literatur im Zusammenhang mit Enzym-Immun-Methoden beschriebenen und in Tabelle 1 zusammengestellten beschränkt. Dabei wurde auf

- kurze Reaktionszeit,
- ausreichende Empfindlichkeit gegenüber POD bei möglichst großer Reaktionsbreite bezüglich kleinster und größter POD-Konzentration,
- eine Möglichkeit der Unterbrechung der Enzymreaktion und der Konservierung des umgesetzten Substrates,
- Stabilität gegenüber chemischen und physikalischen Faktoren, die bei der Durchführung des ELISA einwirken, und
- Praktikabilität bezüglich Herstellung und Anwendung

besonderer Wert gelegt.

Tabelle 1: Substrate zur POD-Aktivitätsbestimmung

Autoren	Art des POD-Nachweises
B.K. VAN WEEMEN, A.H.W.M. SCHUURS, (1972) (86) E.J. RUITENBERG, P.A. STEERENBERG, B.J.M. BROSI (1975) (70)	80 mg Aminosalicylsäure (5 AS) in 100 ml heißem Aqua dest. gelöst, direkt vor Gebrauch pH mit 1 n NaOH auf 6,0 eingestellt; zu 9 ml dieser eingestellten Lösung 1 ml 0,05% H_2O_2 hinzugefügt. Reaktionszeit: 1 Stunde Stop-Reagenz: 1 n NaOH Photometrische Messung bei 449 nm
G.C. SAUNDERS, E.V. CLINARD (1976) (72)	225 mg Aminosalicylsäurehydrochlorid in 100 ml H_2O gelöst (Stammlösung). Arbeitslösung: Zu 9 ml 5 AS·HCl nach Einstellung des pH auf 6,0 mit 1% NaOH 1 ml 0,05% H_2O_2 -Lösung hinzugefügt. Reaktionszeit: 10 Min. Stop-Reagenz: 0,3% NaN_3 -Lösung Stabilisierung durch anschließendes Überführen in 0,005 n H_2SO_4 Photometrische Messung bei 450 nm
G.C. SAUNDERS, M.L. BARTLETT (1977) (73)	0,4 m M ABTS in 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer pH 4,0 gelöst und H_2O_2 hinzugefügt, bis 1,3 mM enthalten waren. Reaktionszeit: 30 Min. Stop-Reagenz: Überführen des Reaktionsproduktes in 0,1 m Citrat-Phosphatpuffer pH 2,8 Photometrische Messung bei 414 nm
Str. AVRAMEAS, B. GUILBERT (1972) (4)	0,6 ml 1 m Phosphatpuffer pH 6,0 0,6 ml 0,3% wäßrige H_2O_2 -Lösung 58,8 ml Aqua dest. Dieser gut durchmischten Lösung unter starkem Rühren 0,5 ml einer 1% o-Dianisidin-Lösung (o-Dianisidin in Methanol) tropfenweise zugefügt. Reaktionszeit: 1 Stunde Stop-Reagenz: 5 n HCl Photometrische Messung bei 400 nm
G.C. SAUNDERS, M.E. WILDER (1974) (74)	Guajacol 1:10.000 in 0,005% wäßriger H_2O_2 -Lösung Reaktionszeit: 15 Min.

Da die in Tabelle 1 aufgeführten Autoren die Wahl der Substrate zum POD-Nachweis meist nicht begründet haben und der Substratumsatz teils visuell, teils photometrisch, mit jeweils verschiedenen Reaktionszeiten sowie mit oder ohne Stop-Reagenz ausgewertet wurde, erschien es zweckmäßig, Vergleiche im kontinuierlichen Substratumsatz in Abhängigkeit von der Zeit und variierenden POD-Konzentrationen anzustellen. Der Substratumsatz wurde in allen Fällen spektralphotometrisch durch Extinktionsmessungen bestimmt.

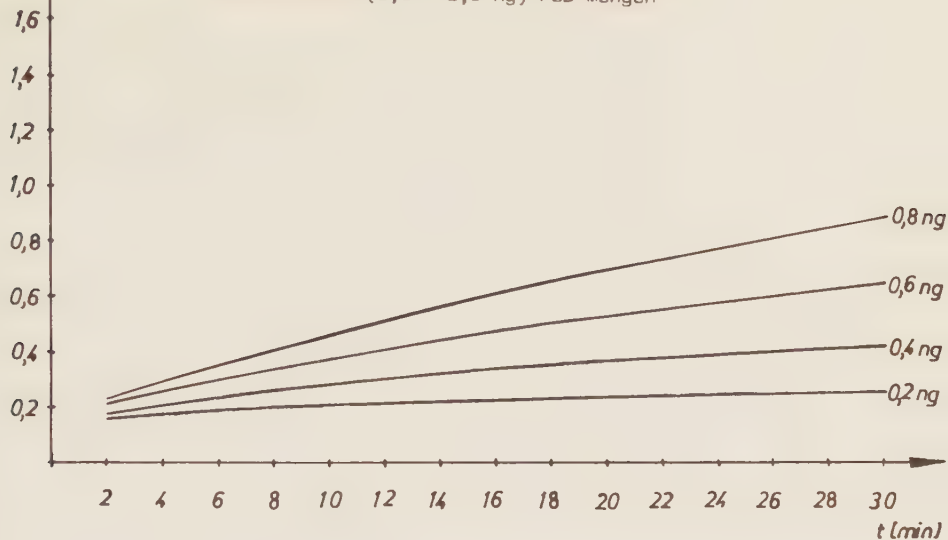
Zu diesem Zweck wurden zunächst POD-Mengen von 10, 20, 30, 40, 50 und 100 ng in jeweils 1 ml 0,1 m Phosphatpuffer pH 6,8, der 1% Bovines Serumalbumin (BSA) enthielt, gelöst. Danach wurden von POD-Lösungen mit 10, 20 und 30 ng/ml jeweils 20 μ l mittels Eppendorf-Pipette in geeichte Quarzküvetten pipettiert, ohne Verzug jeweils 1 ml Substrat zugegeben, gut durchmischt und zusammen mit einer vierten Küvette, die nur Substrat enthielt, nebeneinander in ein Spektralphotometer (Zeiss PM 6) gestellt. Mit Hilfe der Küvettenautomatik gelangten nun die vier Küvetten zwei mal pro Minute über einen Zeitraum von 30 Minuten zur Messung, wobei die einzelnen Meßwerte durch einen angeschlossenen Drucker automatisch aufgezeichnet wurden. Mit den POD-Lösungen von 30 und 40 ng/ml wurde unter erneuter Mitführung eines Substrat-Leerwertes in gleicher Weise verfahren. Nach diesem Schema sind dann alle in Tabelle 1 aufgeführten Substrate mit Ausnahme des Guajacol, bei dem die POD-Konzentrationen zusätzlich auf 50 und 100 ng/ml ausgedehnt wurden, untersucht worden.

Die auf diese Art ermittelten Enzym-Substrat-Beziehungen sind in Abhängigkeit von der Zeit und den POD-Konzentrationen in den Abbildungen 1 - 4 bzw. in Tabelle 2 dargestellt.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde der Guajacol-Umsatz bei POD-Mengen von 0,2 und 0,6 ng nicht graphisch dargestellt, dafür aber bei POD-Mengen von 1 und 2 ng mit in die Abbildung 4 aufgenommen. Die POD-Aktivitätsmessungen unter Verwendung von Aminosalicylsäurehydrochlorid (225 mg/100 ml) sind in Tabelle 2 dargestellt, da bei allen

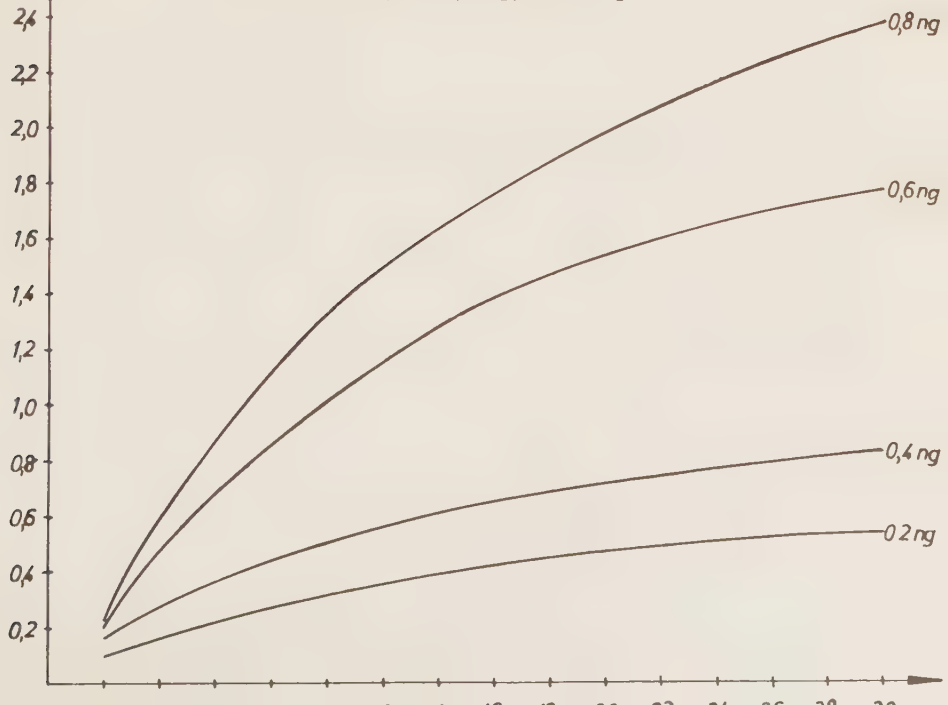
E
49 nm

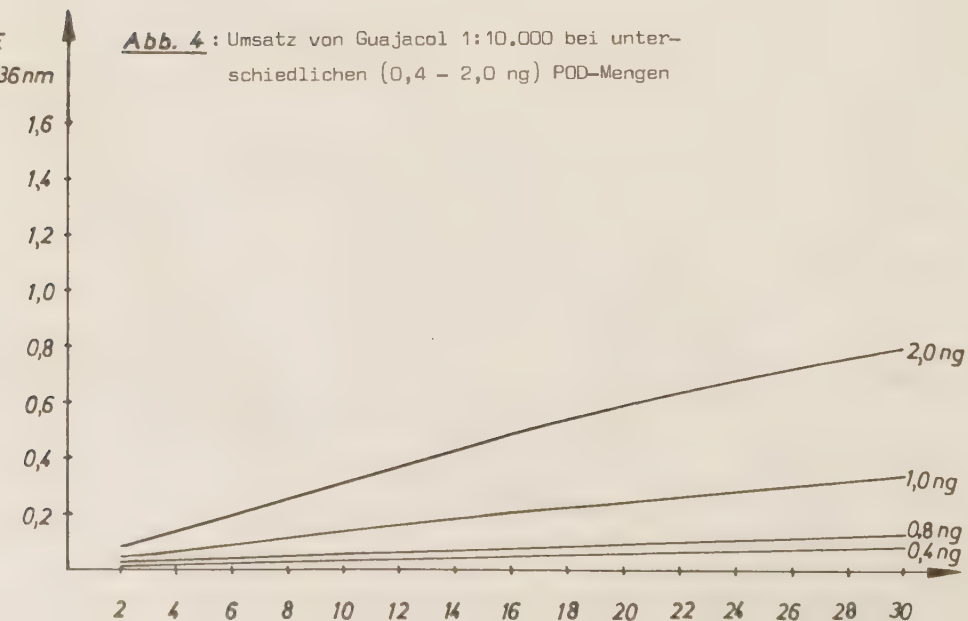
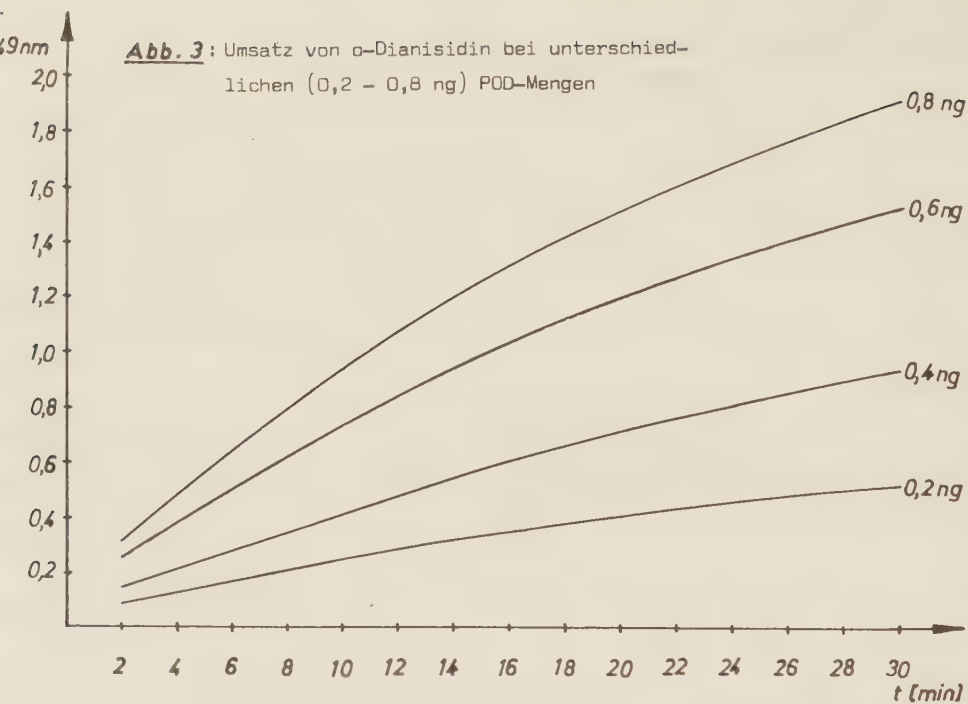
Abb. 1: Umsatz von 5 AS (80 mg/100 ml) bei unterschiedlichen (0,2 - 0,8 ng) POD-Mengen



F
14 nm

Abb. 2: Umsatz von 0,4 mM ABTS bei unterschiedlichen (0,2 - 0,8 ng) POD-Mengen





dort angegebenen POD-Mengen innerhalb einer 30minütigen Meßzeit nur eine sehr geringe Extinktionsänderung festzustellen war. Die Werte der Extinktionsmessungen wurden ab der 5. Minute nach Reaktionsbeginn in die Tabelle aufgenommen, da erst nach dieser Zeit kontinuierlich steigende Extinktionen registriert wurden.

Tabelle 2: Umsatz von Aminosalicylsäurehydrochlorid durch POD

	POD-Konzentrationen				Substrat- Leerwerte
	0,2 ng	0,4 ng	0,6 ng	0,8 ng	
E 450 nm					
nach 5 Min.	0,305	0,320	0,322	0,352	0,299
nach 30 Min.	0,370	0,410	0,429	0,469	0,347

Bei der weiteren Abklärung der Frage, welches Substrat im Rahmen dieser Arbeit am zweckmäßigsten angewandt werden sollte, wurde nun geprüft, wie lange die Substrate nach Ablauf einer bestimmten Reaktionszeit und nach Zusatz eines Stop- bzw. Stabilisierungsreagenzes im Hinblick auf eine spätere Messung ohne Veränderung aufbewahrt werden können. Dies wurde unter den in Tabelle 1 angegebenen Versuchsbedingungen unter Verwendung der für das jeweilige Substrat in Abb. 1 - 4 bzw. Tabelle 2 dargestellten POD-Mengen geprüft. Da die hier verwendeten Substrat-Mengen pro Einzelprobe von denen der genannten Autoren abwichen, wurden Volumina und Konzentrationen der Stop- und Stabilisierungsreagenzien entsprechend dem 1 ml Substrat angeglichen. Die gestoppten bzw. stabilisierten Substrate wurden nun über weitere 30 Minuten photometrisch gemessen, während bei Parallelansätzen auch visuell beurteilt wurde, ob sich Farbveränderungen eingestellt hatten.

Der Stop- bzw. Stabilisierungsvorgang hatte bei den Substraten Aminosalicylsäure, Aminosalicylsäurehydrochlorid und ABTS eine Änderung der Extinktionswerte zur Folge, die nicht mit der Volumenerhöhung

durch Zusatz von Stabilisierungsreagenz zu erklären ist. Deshalb sind bei den POD-Mengen von 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 ng von jedem der drei genannten Substrate die Extinktionswerte vor Unterbrechung der Enzymreaktion mit denjenigen nach erfolgter Stabilisierung verglichen worden. Dazu sind jeweils die Quotienten aus den Extinktionswerten des Substratumsatzes zweier unterschiedlicher POD-Mengen vor und nach dem Stop- bzw. Stabilisierungsvorgang gebildet und ihre Übereinstimmung als Kriterium für die Zuverlässigkeit des Messens bei unveränderter Wellenlänge herangezogen worden

$$\text{(geforderte Bedingung: } \frac{SU^*_{0,2 \text{ ng POD}}}{SU^*_{0,4 \text{ ng POD}}} = \frac{SU^{(*)}_{0,2 \text{ ng POD}}}{SU^{(*)}_{0,4 \text{ ng POD}}) \text{.}$$

Bei dem Substrat o-Dianisidin hat eine Unterbrechung der Enzymreaktion immer einen Farbumschlag von braun nach gelb bewirkt, weshalb dann das gelbe Reaktionsprodukt bei der entsprechenden Wellenlänge von 400 nm gemessen wurde. Die Unterbrechung der Enzymreaktion ist bei der Verwendung von o-Dianisidin nicht nur, wie von AVRAMEAS und GUILBERT (4) empfohlen, nach einer Reaktionszeit von einer Stunde vorgenommen worden, sondern auch schon früher. Dazu wurden mit diesem Substrat für POD-Mengen von 0,2 ng, 0,4 ng, 0,6 ng und 0,8 ng je 12 Proben angesetzt. In Abständen von 5 Minuten wurde die Enzymreaktion bei je einer Probe der verschiedenen POD-Mengen unterbrochen. Die photometrische Auswertung erfolgte auch hier jeweils vor und nach dem Stop-Vorgang.

3.1.2.2. Standardisierung von Peroxidase und Enterotoxin

Zur Standardisierung der POD wurde aus einer 100 mg-Charge 1 mg Lyophilisat abgewogen und in 1 ml PBS (0,015 m Phosphatpuffer, 0,15 m NaCl), pH 7,2, gelöst. Davon wurden nun Verdünnungen mit PBS hergestellt, die 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 75, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2,5 und 1 µg POD/ml enthielten.

* Substratumsatz ungestoppt

(*) Substratumsatz gestoppt

Die bei 280 nm (Proteingehalt) und 403 nm (POD-Gehalt) von diesen Verdünnungen ermittelten Extinktionswerte wurden dann als Eichwerte für später entnommene POD-Mengen verwendet. Als Bezugswerte zur Berechnung des Proteingehaltes der entsprechenden POD-Verdünnungen wurden Extinktionswerte (280 nm) aus Verdünnungen von reinstem BSA (Serva, Heidelberg) in PBS zugrundegelegt und zusammen mit den POD-Werten in Abbildung 5 dargestellt.

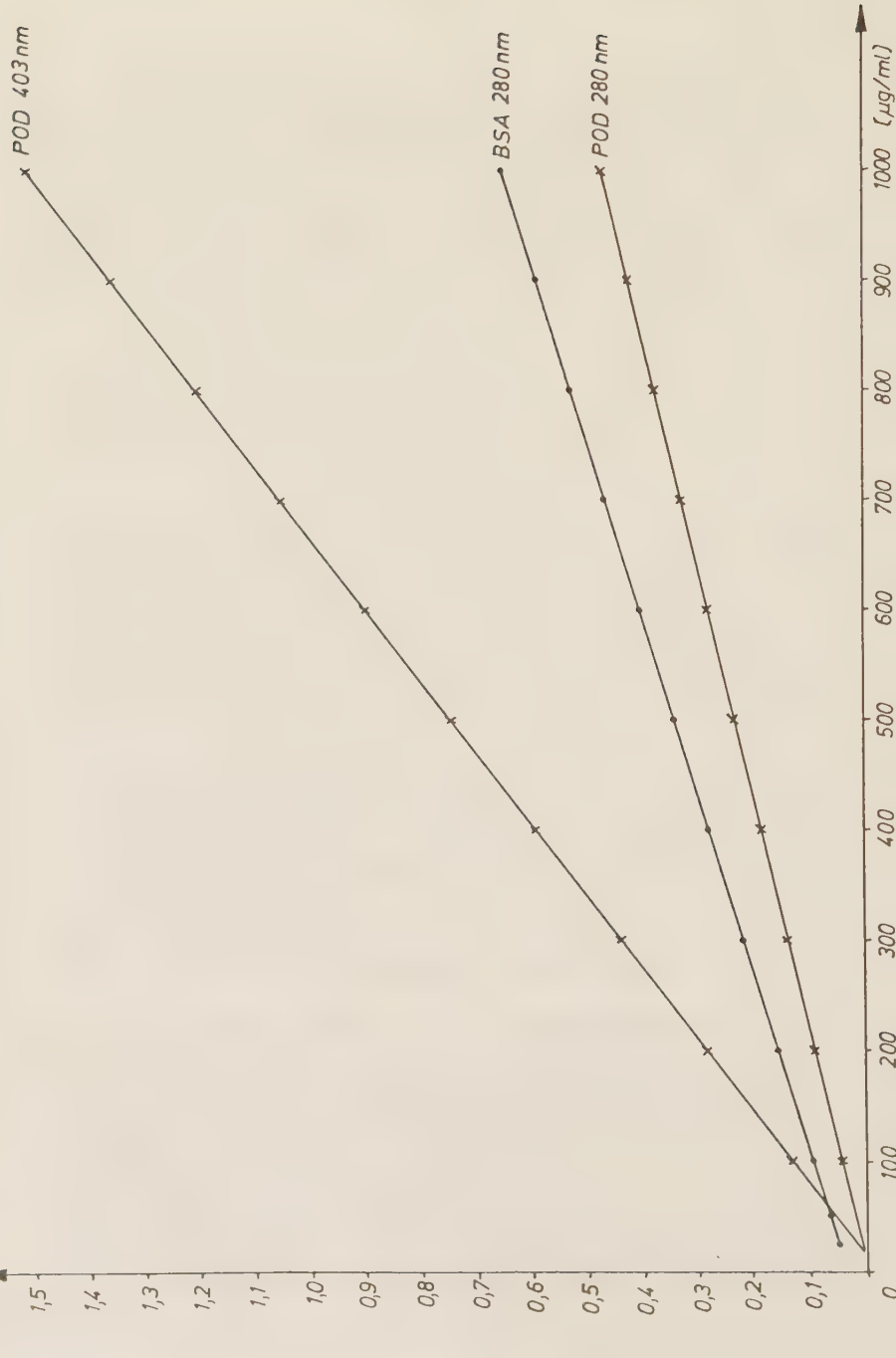
Für geringe POD-Konzentrationen wie 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 und 40 ng/ml wurde eine Eichkurve über die Enzymaktivitätsmessung aufgestellt (Abbildung 6). Die hierzu verwendeten Verdünnungen wurden mit 0,1 m Phosphatpuffer, pH 6,8, der 1% BSA enthielt, angelegt. Von jeder dieser Verdünnungsstufen wurden jeweils 20 µl in ein Glasreagenzröhrchen pipettiert und 1 ml einer o-Dianisidin-Lösung (Tabelle 1) zugesetzt. Nach 30 Minuten Reaktionszeit (Zimmertemperatur) wurde jede Probe nach Zusatz eines Tropfens 5 n HCl gut auf einem Mixomat (Boscamp) durchmischt und 10 Minuten später bei 400 nm gemessen. Die so erhaltenen Extinktionswerte wurden durch Abzug des Leerwertes (E 400 nm von 1 ml Substrat + 1 Tropfen 5 n HCl) korrigiert.

Zur Standardisierung des Enterotoxins wurde einerseits 1 ml Toxin-Lyophilisat in 10 ml PBS, pH 7,2, gelöst, um danach mit demselben Puffer Verdünnungen von 1:100, 1:200, 1:400 und 1:500 herzustellen, andererseits wurden aus standardisiertem Enterotoxin B (Serva) Lösungen mit Toxingehalten von 10, 7,5, 5, 2,5 und 1,25 µg/ml mit PBS-Puffer für die quantitative Toxinbestimmung im MANCINI-Test (einfache radiale Immundiffusion) vorbereitet.

Für den MANCINI-Test wurden 7,5 ml eines 1%igen Agarose-Agars, der mit 0,02 m Barbitalpuffer, pH 7,4, hergestellt worden war, im kochenden Wasserbad bis zur völligen Transparenz erhitzt, auf 60°C abgekühlt, mit 0,25 ml eines aus eigener Produktion stammenden SEB-Antiserums vermischt und damit ein auf einem Nivelliertisch befindlicher Objektträger (75 x 52 mm) beschichtet. Nach Erstarren des Gels wurde der beschichtete Objektträger mindestens eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurden in die ausreichend ge-

$E_{403\text{ nm}}^{280\text{ nm}}$

Abb. 5 : Eichkurven für POD und BSA



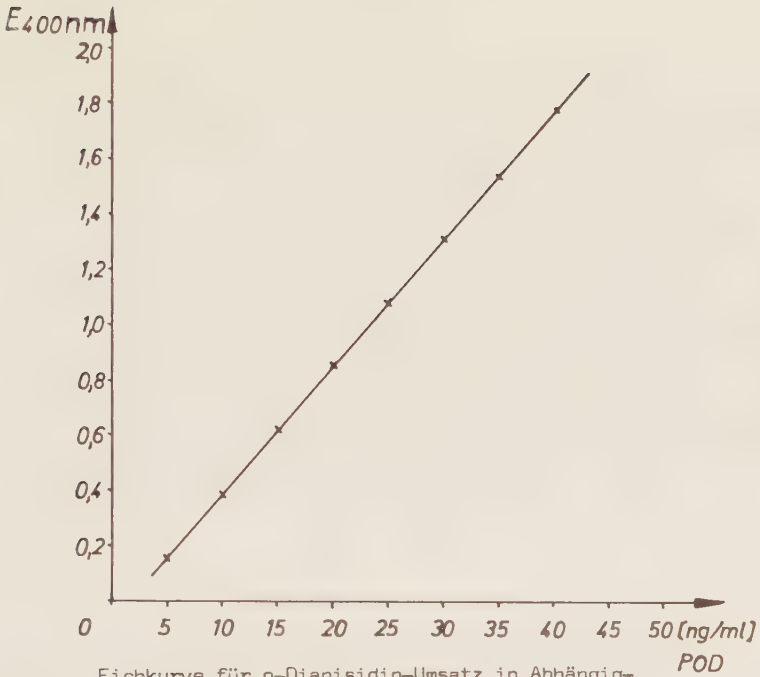


Abb. 6: Eichkurve für o-Dianisidin-Umsatz in Abhängigkeit der POD-Konzentration bei Abbruch der Enzymreaktion nach 30 Minuten

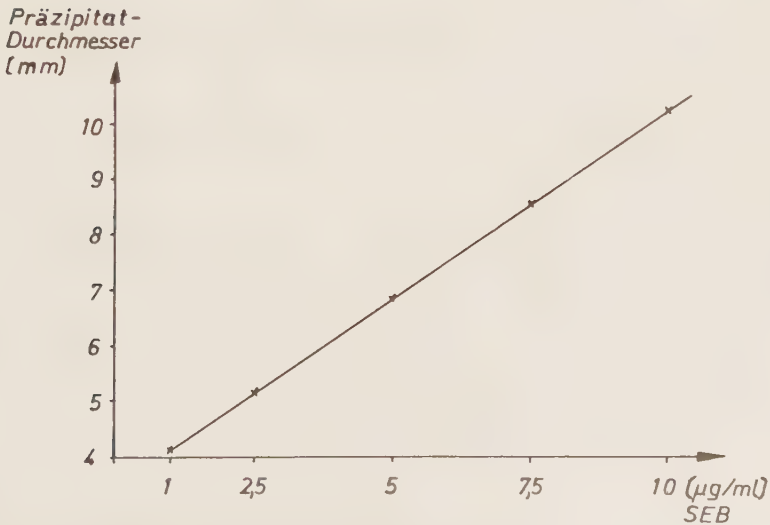


Abb. 7: Eichkurve für SEB (MANCINI-Test) bei einer Diffusionszeit von 48 Stunden

härtete 2 mm dicke Gelschicht 20 Löcher ($\varnothing$ 3 mm) mit einem Fassungsvermögen von 7 μ l gestanzt und mit den zuvor angegebenen Toxinproben (Lyophilisat-Verdünnungen, Referenztoxin-Lösungen) randvoll gefüllt worden (Doppelansatz jeder Toxinprobe). Nach 48 Stunden Diffusionszeit erfolgten Trocknung, Färben und Entfärben wie im modifizierten OUCHTERLONY-Test (SOMMERFELD und TERPLAN (78)). Da die Durchmesser der konzentrisch um die Probenlöcher gebildeten Präzipitate nach ausreichender Diffusionszeit direkt proportional der Toxinkonzentration sind, konnten nun nach Aufstellung einer Eichkurve (Abb. 7) anhand der Referenztoxin-Proben die Toxingehalte der übrigen Proben ermittelt werden. Vor der Toxin-kopplung wurde eine SDS-Polyacrylamidgel-Diskelektrophorese (85) durchgeführt, wobei die Gelstärke auf 7,5% und die zur Entfärbung dienende Essigsäure auf 7,5% abgeändert wurden.

3.1.2.3 Kopplung von Peroxidase an Enterotoxin

Die Kopplung von POD an SEB erfolgte in zwei Abschnitten, in Anlehnung an die von AVRAMEAS und TERNYNCK (3) zur Kopplung von Peroxidase an Immunglobuline beschriebenen Methode, jedoch mit Abweichungen hinsichtlich der Glutaraldehydkonzentration. Dazu wurden 10 mg POD in 1 ml 0,1 m Phosphatpuffer, pH 6,8, der 2,5% Glutaraldehyd enthielt, unter leichtem Rühren gelöst und 18 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Überschüssiger Glutaraldehyd wurde danach durch Gelfiltration über Sephadex G-25 coarse, das zuvor mit 0,15 m NaCl äquilibriert und in eine Chromatographiesäule (60 x 0,9 cm) verbracht worden war, entfernt, wobei auch mit dem Äquilibrium eluiert wurde. Die gelben, aktivierte POD enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und mittels Ultrafiltration (magnetgerührte Zelle; Amicon, Witten) unter Verwendung einer Diaflo PM₁₀-Membran auf 1 ml konzentriert. Zu diesem Konzentrat wurden 10 mg gereinigtes SEB, das in 1 ml 0,15 m NaCl gelöst war, und 0,2 ml eines 0,1 m Natriumcarbonat-bicarbonat-Puffers, pH 9,5, nacheinander unter Rühren zugesetzt und 18 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.2.4 Überprüfung des Kopplungserfolges und Gewinnung des Enzym-Enterotoxin-Konjugates

Um Aufschluß darüber zu erhalten, ob und in welchem Maße eine Kopplung zwischen POD und SEB erfolgt war, wurde die Lösung, die die Kopplungsreagenzien enthielt, mittels Ultrafiltration auf 0,5 ml konzentriert und durch Gelfiltration über Sephadex G-75 superfine chromatographisch aufgetrennt. Sephadex wurde dazu zuvor mit 0,02 M Phosphatpuffer, pH 6,8, äquilibriert, in eine Chromatographiesäule (75 x 1,9 cm) gegossen und unter niedrigem Arbeitsdruck mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis mindestens ein Säulenvolumen an Flüssigkeit durchgelaufen war. Unter dem gleichen Arbeitsdruck wurde auch mit dem zuvor genannten Puffer eluiert.

Die über einen Fraktionensammler (Columa, Lorch) erhaltenen Fraktionen wurden einzeln bei 280 nm auf Proteingehalt und bei 403 nm auf POD-Gehalt untersucht. Daran schloß sich eine Molekulargewichtsbestimmung an, indem ein Gemisch aus Eichproteinen für die Gel-Chromatographie unter gleichen Bedingungen über die Chromatographiesäule geschickt wurde.

Die Elutionsvolumina konnten nun mit denen aus dem Kopplungsversuch stammenden aufgetrennten Einzelsubstanzen verglichen werden. Teilweise wurde zur Molekulargewichtsbestimmung auch eine SDS-Polyacrylamid-Diskelektrophorese nach der unter 3.1.2.2 angegebenen Methode durchgeführt.

Der Toxingehalt jeder einzelnen im Bereich eines peaks liegenden Fraktion wurde serologisch im MANCINI-Test bestimmt. Aufgrund des ermittelten Protein-, POD- und Toxingehaltes konnte nun das molare Verhältnis von POD:Toxin bestimmt werden.

3.2. Ergebnisse

Die vergleichenden Untersuchungen zur Substratauswahl sind weitestgehend auf die von den entsprechenden Autoren angegebenen Versuchsbedingungen beschränkt worden.

Aus den Abbildungen 1 bis 4 und Tabelle 2 geht hervor, welches Substrat bei definierten POD-Mengen am empfindlichsten reagiert, wie der Substratumsatz zeitlich verläuft und welcher Zusammenhang zwischen den Extinktionswerten, die ein Maß für den Substratumsatz darstellen, und den POD-Mengen bei den verschiedenen Substraten besteht. Für den Nachweis von POD mit Konzentrationen von 0,2 bis 0,8 ng nimmt die Empfindlichkeit der Substrate in nachstehender Reihenfolge ab: ABTS, o-Dianisidin, 5 AS, Guajacol, Aminosalicylsäurehydrochlorid.

Im Gegensatz zu Aminosalicylsäurehydrochlorid zeigen die anderen Substrate bei fortlaufender Messung der Enzymreaktion während der gesamten Reaktionszeit keinen linearen Substratumsatz. Allerdings läßt sich bei o-Dianisidin, Guajacol und 5 AS für bestimmte POD-Konzentrationsbereiche noch ein annähernd linearer Verlauf des Substratumsatzes bei fortlaufender Messung erkennen. Bei o-Dianisidin ist jedoch ein linearer Verlauf des Substratumsatzes bei allen angegebenen POD-Konzentrationen und einem Reaktionszeitraum von 30 Minuten festzustellen, wenn mit Stop-Reagenz gearbeitet wird.

Die unterschiedlichen Extinktionswerte von o-Dianisidin bei kontinuierlicher bzw. unterbrochener Enzymreaktion sind in Abbildung 8 dargestellt. Betrachtet man den Bereich zwischen 30 und 60 Minuten, besteht nur noch für die POD-Menge von 0,2 ng ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und POD-Konzentration. Abhängig von steigender POD-Konzentration und zunehmender Reaktionszeit konnte eine leichte Trübung des umgesetzten Substrates beobachtet werden, die stets durch Zusatz von Stop-Reagenz aufgehoben werden konnte.

Abb. 8: Vergleich des Umsatzes von o-Dianisidin bei unterschiedlichen (0,2 – 0,8 ng) POD-Mengen mit und ohne Unterbrechung der Reaktion
 —x— 400 nm (gestoppt)
 — 449 nm



Für die übrigen mit Stop- bzw. Stabilisierungsreagenz durchgeführten Enzymreaktionen hatte sich nach Unterbrechung eine Abnahme der Extinktionswerte ergeben. Die Berechnung von Quotienten dieser Substrate in der unter 3.1.2.1 angegebenen Weise vor und nach Abbruch der Enzymreaktion ergab Konstanten, die bestätigten, daß eine Messung des Substratumsatzes mit unveränderter Wellenlänge zulässig ist.

Trotz größerer Empfindlichkeit des ABTS gegenüber o-Dianisidin wurde o-Dianisidin wegen der schnellen und materialsparenden Handhabung des Stop-Vorganges und des linearen Substratumsatzes bei POD-Konzentrationen von 0,2 bis 0,8 ng vorgezogen.

Aufgrund der photometrischen Messungen von POD-Lyophilisat-Verdünnungslösungen (3.1.2.2) bei 403 und 280 nm wurde bei den daraus aufgestellten Eichkurven (Abbildung 5) ein Verhältnis für $E_{403 \text{ nm}}:E_{280 \text{ nm}}$ von 3,2 ermittelt. Anhand der BSA-Eichkurve (Abbildung 5) ergab sich für das verwendete POD-Lyophilisat ein Proteingehalt von 60%, was um 4% unter dem vom Hersteller angegebenen Wert liegt. Die Enzymaktivität ist für POD-Konzentrationen von 5 bis 40 ng/ml durch Extinktionswerte des o-Dianisidin-Umsatzes in Abbildung 6 dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, daß eine lineare Proportionalität zwischen o-Dianisidin-Umsatz (nach 30 Minuten Reaktionszeit) und POD-Konzentrationen bis 30 ng/ml besteht. Für die POD-Konzentrationen von 35 und 40 ng/ml gilt dies allerdings nur noch annähernd.

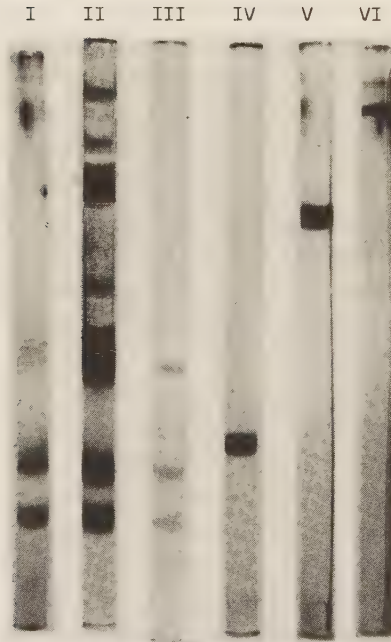
Vor der Kopplung von POD und SEB ist anhand des MANCINI-Tests unter Verwendung der in Abbildung 7 dargestellten Eichkurve für SEB der Toxingehalt des SEB-Lyophilisats bestimmt und dabei ein Gehalt von 800 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Lyophilisat ermittelt worden. In der SDS-Polyacrylamid-

Diskelektrophorese (Abb. 9) erscheinen vom Toxinlyophilisat 3 Banden; dabei liegt der größere Anteil im Molekulargewichtsbereich unter 21.500 (siehe Vergleichssubstanz Trypsininhibitor).

Da in ersten Kopplungsversuchen bei einer Glutaraldehyd-Konzentration von 1,25%, wie von AVRAMEAS und TERNYNCK (3) empfohlen, viel hochmolekulares Polymer mit viel Toxin und geringer POD-Aktivität entstand, wurden einige Variationen hinsichtlich Glutaraldehydkonzentration vorgenommen. Dabei erwies sich die Verwendung von 1 ml 2,5% Glutaraldehydlösung zur Aufnahme von 10 mg POD als zufriedenstellend. Optimale Bedingungen wurden wegen Materialersparnis nicht ermittelt. Bei den letztgenannten Aktivierungsbedingungen für POD entstand im Laufe der Kopplung mit SEB relativ wenig hochmolekulares Polymer mit geringem SEB-Anteil (siehe Abb.10, Fraktionen-Pool I) im Vergleich zu früher verwendeten geringeren Glutaraldehyd-Konzentrationen.

Fraktionen-Pool II in Abb.10 enthält aufgrund photometrischer Messung und serologischer Toxinbestimmung (MANCINI-Test) POD und SEB im molaren Verhältnis von 1:1. Aufgrund der Lage des Fraktionen-Pools II in Abb.10 kann ein Molekulargewicht für das darin enthaltene Kopplungsprodukt von 70.000 angenommen werden. Fraktionen-Pool III besteht nur aus freiem SEB. Dieser hohe Anteil freien Toxins beruht z.T. auf dem Mangel an aktivierter POD, der sowohl durch Adsorption aktivierter POD während der Gel-Chromatographie über Sephadex G-25 als auch durch Adsorption an die PM_{10} -Membran bei der Ultrafiltration bewirkt wurde. Die in Abb. 9 zugrunde liegende Kopplung wurde zwar mit der gleichen Gesamt-Konzentration an Glutaraldehyd wie bei der in Abb. 10 dargestellten durchgeführt, allerdings ist der Glutaraldehyd in 0,3 ml Puffer gelöst worden. Vermutlich begünstigt das geringe Volumen der Glutaraldehydlösung die Bildung von mehreren POD-Polymeren.

Abb. 9: SDS-Polyacrylamidgel-Diskelektrophorese
Auftrennung von SEB, POD-SEB-Rohkonjugat
und Eichsubstanzen



- I: SEB (aufgelöstes Lyophilisat)
- II: POD-SEB-Rohkopplungsprodukt
- III: SEB ungekoppelt, nach Auftrennung eines
Kopplungsproduktes über Gelchromatographie
- IV: Trypsininhibitor aus Sojabohnen
- V: Albumin aus Rinderserum
- VI: RNA-Polymerase von E. coli

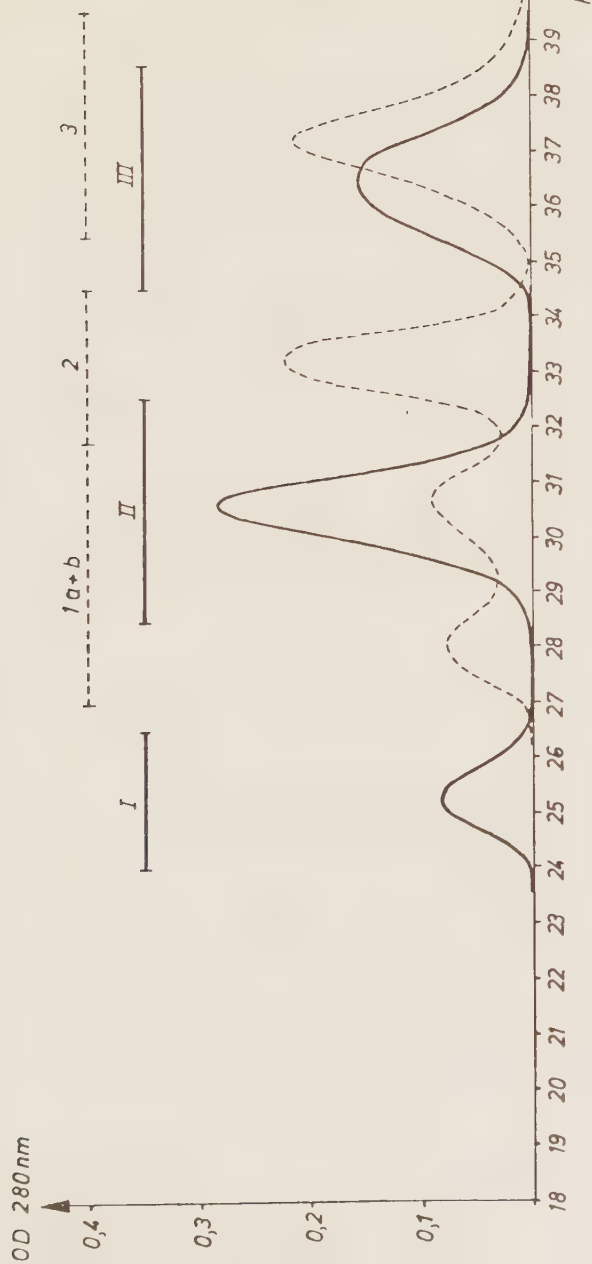


Abb. 10 : Chromatographie von Koppelungsprodukt und Vergleichssubstanzen an Sephadex G-75 superfine (1 Fraktion = 5,6 ml)

Fraktionen-Pool I, II, III = aufgetrenntes Roh-Kopplungsprodukt
 Fraktionen-Pool 1 a + b = Bovines Serumalbumin (uneinheitlich)
 Elutionsabschnitt 2 = Albumin aus Hühnerei
 Elutionsabschnitt 3 = Chymotrypsinogen A

3.3 Herstellung des Immunosorbens

3.3.1 Material

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete SEB-Antiserum (Kaninchen) stammte aus institutseigener Produktion. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte in wöchentlichen Abständen bei subcutaner Applikation von formaldehydinaktiviertem (84), an Aluminiumhydroxyd adsorbiertem (45) SEB in Konzentrationen von 30, 60, 120, 250, 500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$. Nach Untersuchung auf den Gehalt an präzipitierenden, gegen SEB gerichteten Antikörpern, wurden die gewonnenen Seren teils mit Natriumsulfat, teils mit Ammoniumsulfat präzipitiert, rekonstituiert und sterilfiltriert. Dieses sulfathaltige Anti-SEB- γ -Globulin wurde in geeigneten Ampullen lyophilisiert und bei -18°C gelagert.

Zur Erstellung einer Eichkurve für Kaninchen- γ -Globulin wurde γ -Globulin-Lyophilisat vom Kaninchen (Serva, Heidelberg) verwendet, das laut Hersteller in der Cellogel-Elektrophorese zu 95% γ -Globulin aufweist und mit der COHN-Fraktion II identisch ist.

Als Adsorbermaterial für Anti-SEB-haltiges γ -Globulin wurden strahlensterilisierte Polystyrenröhrchen (70 x 11 mm) (Nunc, Wiesbaden) mit rundem Boden und Stopfen verwendet. Zur Sterilfiltration dienten Millex-Sterilfilter, 0,22 μm Porenweite (Millipore, Neu-Isenburg). Weiterhin kamen Peroxidase-Enterotoxin-Konjugat (POD-SEB-Konjugat) (3.1.2.4), Albumin aus Rinder Serum (BSA) krist., reinst (Serva) und Chemikalien wie o-Dianisidin und H_2O_2 in phosphatgepufferter, wäßriger Lösung als Substrat für POD, 5 n HCl als Stop-Reagenz und Natriumazid als Konservierungsstoff zur Anwendung.

3.3.2 Methodik

3.3.2.1 Aufbereitung und Standardisierung des Enterotoxin-B-Antiserums

Zur Herstellung des Immunosorbens wurde im allgemeinen eine Ampulle Anti-SEB-haltiges γ -Globulin-Lyophilisat mit 10 ml PBS, pH 7,2, rekonstituiert. Diese Lösung wurde dann mittels magnetgerührter Ultrafiltrationszelle (400 ml-Zelle) unter Verwendung einer PM₁₀-Membran solange mit PBS als Filtrationsflüssigkeit dialysiert, bis der γ -Globulin-haltige Filtrerrückstand sulfatfrei war. Der Sulfatnachweis erfolgte an einem kleinen Volumen nach vorheriger Ansäuerung mit HCl mittels 1% Bariumchlorid-Lösung. Der ausreichend dialysierte und auf etwa 10 ml konzentrierte Filtrerrückstand wurde der Ultrafiltrationszelle mit einer Pipette entnommen, die Membran nochmals mit etwa 5 ml PBS nachgespült und diese weniger konzentrierte γ -Globulin-Lösung mit der zuvor entnommenen gepoolt und sterilfiltriert. Diese sterile Anti-SEB-haltige γ -Globulin-Stammlösung wurde nun photometrisch bei 280 nm gemessen und ihr Proteingehalt anhand einer mittels Kaninchen- γ -Globulin erstellten Eichkurve bestimmt. Aus dieser Stammlösung, die im allgemeinen weniger als 1 mg Protein/ml enthielt, wurden mit PBS bzw. 0,1 m Natriumcarbonatpuffer, pH 9,6, die jeweils gewünschten Verdünnungen hergestellt.

3.3.2.2 Einflüsse von Antiserum-Konzentration, Inkubationsart, Inkubationszeit und Lösungsmittel auf die Bindung des Immunglobulins an Polystyrenröhrchen

Zunächst wurden aus der Anti-SEB- γ -Globulin-Stammlösung mit PBS Verdünnungen hergestellt, die Proteingehalte von 1, 2, 4, 5, 7,5, 10, 15, 20, 50, 75 und 100 μ g/ml hatten. Von jeder dieser Verdünnungen wurden jeweils mehrere Röhrchen mit je 1 ml mittels Eppendorf-Pipette beschickt und drei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Globulin-Lösung mit einer Pasteur-

Pipette über eine Wasserstrahlpumpe abgesaugt, jedes Röhrchen mit etwa 2 ml PBS gespült, anschließend mit 2 ml 1% BSA-Lösung in PBS mit 0,1% Natriumazid beschickt und meist über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Die Dosierung von BSA und Waschflüssigkeiten erfolgte mit einer 40 ml Muto^(R)-Spritze (Hauptner, Solingen). Nach dieser Inkubation wurde die BSA-Lösung abgesaugt und die Röhrchen zweimal mit je 2 ml Tween-NaCl (0,9% NaCl, 0,05% Tween 20) gewaschen. Nun wurden jeweils drei Röhrchen jeder Anti-SEB- γ -Globulin-Verdünnungsstufe mit je 1 ml POD-SEB-Konjugat mit einem SEB-Gehalt von 10 ng/ml (3.1.2.4) beschickt und 30 Minuten auf einem Taumler bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Absaugen des Konjugates wurde zunächst wieder zweimal mit Tween-NaCl gespült und dann jeweils 1 ml o-Dianisidin-Substrat (Tabelle 1) mittels Eppendorf-Pipette in die Röhrchen dosiert, 30 Minuten auf dem Taumler bei Zimmertemperatur inkubiert und danach die Enzymreaktion mit einem Tropfen 5 n HCl abgebrochen. Der Substratumsatz wurde frühestens 10 Minuten nach dem Stop-Vorgang spektralphotometrisch bei 400 nm gemessen. Die Röhrchen mit stärkster Extinktion wurden als diejenigen mit maximaler Antikörperbindung bewertet. Um die günstigste Inkubationsart zur Beschichtung der Röhrchen zu ermitteln, wurden 20 Röhrchen mit jeweils 1 ml Anti-SEB- γ -Globulin-Lösung (5 μ g Protein/ml) beschickt, davon je 5 Röhrchen im Brutschrank bei 37°C, im Wasserbad bei 37°C, im Schüttelwasserbad bei 37°C und auf dem Taumler bei Zimmertemperatur drei Stunden inkubiert. Anschließend wurden – wie schon zuvor beschrieben – alle Röhrchen über Nacht mit BSA stehengelassen, mit Waschlösung behandelt, mit Konjugat inkubiert und die Antikörperbindung an die Polystyrenröhrchen über den o-Dianisidin-Substratumsatz nach 30 Minuten Reaktionszeit festgestellt.

Der Einfluß der Inkubationszeit auf die Antikörperbeschichtung der Polystyrenröhrchen wurde durch Inkubation von jeweils 10 Röhrchen für drei Stunden und für 15 Stunden (über Nacht) im Wasserbad bei 37°C sowie 15 Stunden bei Zimmertemperatur untersucht. Die Ermittlung der gebundenen Antikörper erfolgte wie schon zuvor beschrieben.

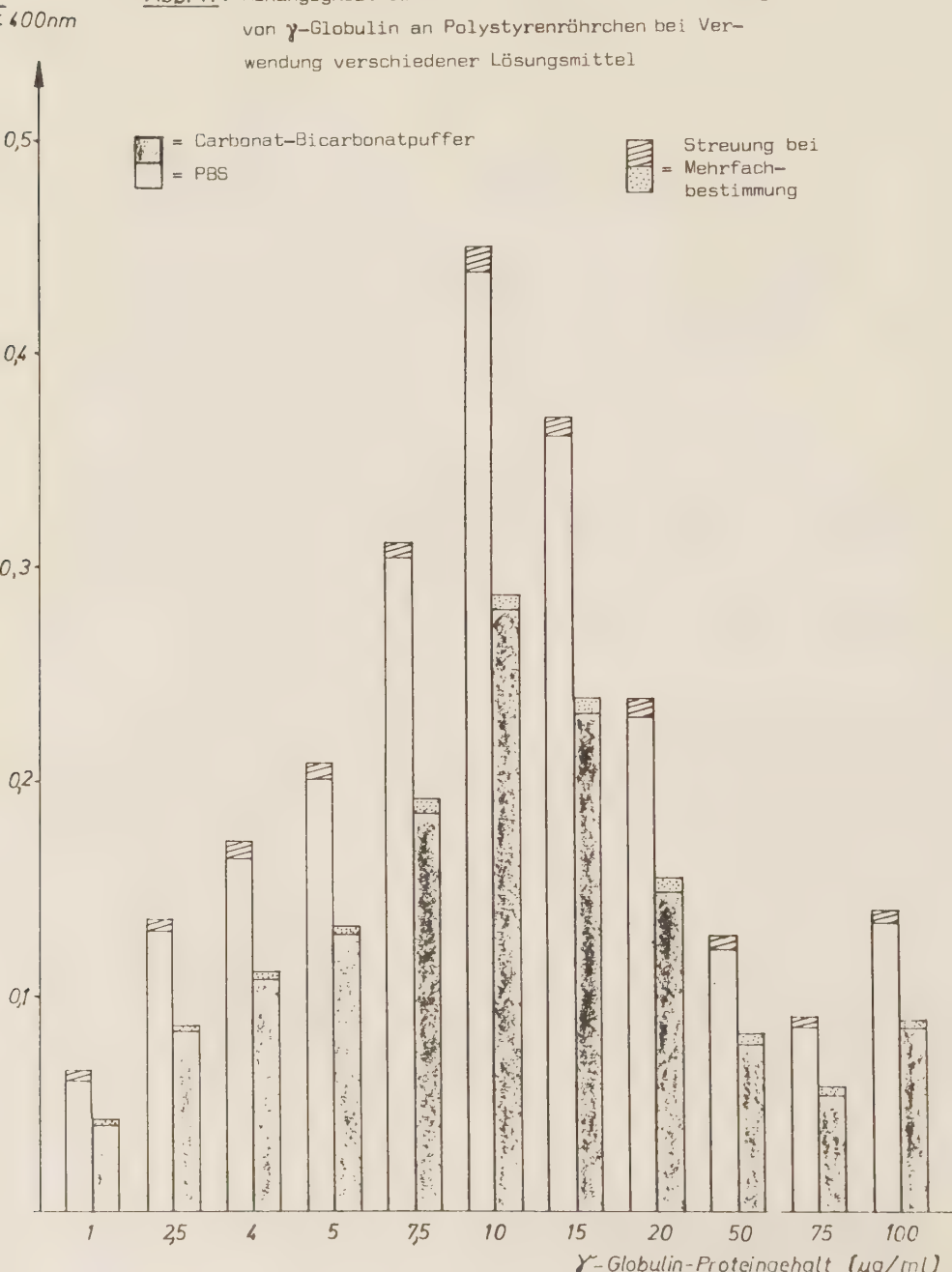
Bei der Prüfung der zur Antikörper-Adsorption geeigneten Lösungsmittel (Puffer-Lösungen) wurde Anti-SEB- γ -Globulin zum einen in PBS (0,015 m K_2HPO_4 , 0,015 m NaH_2PO_4 , 0,15 m NaCl), pH 7,2, zum anderen in 0,1 m Natriumcarbonat-bicarbonat-Puffer, pH 9,6, gelöst und mit diesen Puffern dann Verdünnungen hergestellt, die Proteinkonzentrationen von 1, 2,5, 4, 5, 7,5, 10, 15, 20, 50, 75 und 100 $\mu\text{g/ml}$ aufwiesen. Von jeder dieser Proteinkonzentrationen mit den verschiedenen Lösungsmitteln wurden 5 Röhrchen nach demselben Prinzip, wie schon zuvor beschrieben, angelegt, entsprechend weiterbehandelt und mit Konjugat (10 ng SEB/ml) für 30 Minuten auf dem Taumler inkubiert. Der Grad der γ -Globulinadsorption wurde dann wieder über den der Bindung von enzymmarkiertem SEB proportionalen Substratumsatz erkennbar.

3.4 Ergebnisse

Die Proteinbestimmung des SEB-Antiserums anhand einer Kaninchen- γ -Globulin-Eichkurve (Messung bei 280 nm) lieferte bei wiederholten Messungen in größeren Zeitabständen reproduzierbare Werte und war deshalb zur Standardisierung gut geeignet. Die Dialyse einer Ampulle rekonstituierten Anti-SEB-haltigen γ -Globulin-Lyophilisats konnte meist nach 800 ml Flüssigkeitsdurchlauf in der Ultrafiltrationszelle, was etwa zwei Stunden dauerte, abgeschlossen werden.

Der Einfluß der Proteinkonzentration des Antiserums auf die Bindung an Polystyrenröhrchen ist in Abbildung 11 dargestellt. Daraus geht hervor, daß zunächst durch Erhöhung der Proteinkonzentration auch die Bindung an die Kunststoffröhrchen erhöht wird, die jedoch dann bei weiterer Zunahme des Proteingehaltes stark abfällt. Die Bindung von Protein nimmt erst wieder bei extrem hohen zur Inkubation verwendeten Konzentrationen (z.B. 100 $\mu\text{g/ml}$) zu. Als günstigste Inkubationsart zur Adsorption von γ -Globulin an Polystyrenröhrchen erwies sich der Aufenthalt der Röhrchen im Wasserbad bei 37°C ohne Bewegung. Bei dieser Inkubationsart wurde das Globulin sowohl am stärksten als auch am gleichmäßigsten adsorbiert.

Abb. 11: Abhängigkeit zwischen Konzentration und Bindung von γ -Globulin an Polystyrenröhrchen bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel



Hinsichtlich der Inkubationszeit ergaben 15 Stunden bei Zimmertemperatur eine um 10% höhere Adsorption von Protein an die Röhrchen gegenüber der dreistündigen Wasserbad-Inkubation bei 37°C. Die Proteinadsorption durch 15stündiges Inkubieren im Wasserbad bei 37°C war nicht zufriedenstellend, da sie nicht gleichmäßig erfolgte und somit die Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen in Frage gestellt wird.

Der Einfluß des Lösungsmittels auf die Antikörperbindung an die Polystyrenröhrchen ist in Abbildung 11 dargestellt. Dort zeigt sich, daß die Antikörperadsorption bei Verwendung von Natriumcarbonat-bicarbonat-Puffer, pH 9,6, schwächer ist als bei Verwendung von PBS als Lösungsmittel. Rechnerisch beträgt die Antikörperbindung in Carbonatpuffer etwa 63% derjenigen in PBS. Aus diesem Grunde wurde die Globulin-Adsorption an Röhrchen im weiteren immer mit PBS vorgenommen.

3.5 Anwendung des ELISA an Enterotoxin B-Standards

3.5.1 Material

Das verwendete Immunsorbens wurde durch Inkubation der Polystyrenröhrchen mit γ -Globulin-Lösung (5 μ g Protein/ml) hergestellt und bis zum Tag vor Gebrauch mit dieser Lösung verschlossen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Das POD-SEB-Konjugat wurde konzentriert (100 μ g SEB/ml) und mit 1% BSA stabilisiert in mehreren Portionen bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Als Referenztoxin wurde sowohl SEB aus institutseigener Produktion als auch kommerziell erworbenes (Serva) eingesetzt.

Zur Überprüfung des ELISA auf unspezifische Reaktionen bzw. Kreuzreaktionen mit anderen Toxintypen wurden Enterotoxin A (SEA), Enterotoxin C (SEC), Enterotoxin D (SED) und Enterotoxin E (SEE)

(Serva, Heidelberg) sowie Protein A von Staphylococcus aureus (Deutsche Pharmacia, Freiburg) verwendet.

Neben diversen Pufferlösungen wurde außerdem Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Wesel) zur Herstellung von Standard-Toxin-Reihen benötigt.

3.5.2 Methodik

3.5.2.1 Einfluß verschiedener Reaktionszeiten und Inkubationsarten auf den Test

In diesem Untersuchungsbereich wurden nun u.a. auch Versuche durchgeführt, in denen neben dem enzymmarkierten auch unmarkiertes Toxin verwendet wurde.

Zunächst wurden SEB-Standards sowohl von institutseigenem als auch kommerziell erhaltenem SEB angelegt. Dazu wurde das entsprechende SEB jeweils in Lösungsmitteln wie 0,9% NaCl, PBS pH 7,2 mit und ohne Zusatz von 1% BSA, 0,1 m Phosphatpuffer (di-Kaliumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat) oder 0,37% Brain Heart Infusion in 0,9% NaCl-Lösung so aufgelöst, daß Verdünnungen mit 1, 0,5, 0,25, 0,1 µg/ml bzw. 50, 10, 5, 1, 0,5, 0,1, 0,05 und 0,01 ng/ml vorlagen. Von der mit 1% BSA stabilisierten POD-SEB-Konjugat-Stammlösung (100 µg SEB/ml) wurden nun Verdünnungen von 1:1000, 1:2000, 1:3000 bis 1:10.000 mit PBS hergestellt und 30 Minuten in den beschichteten Antikörperröhrchen inkubiert, um zunächst die optimale Konjugat-Verdünnung für die hier verwendeten Röhrchen zu ermitteln. Dazu wurden von jeder Konjugat-Verdünnung in jeweils zwei Röhrchen je 0,5 ml und 0,5 ml PBS pipettiert, die Röhrchen 30 Minuten auf einem Taumler bei Zimmertemperatur inkubiert, danach die Konjugat-Lösungen abgesaugt, die Röhrchen zweimal mit Tween-NaCl gewaschen und für weitere 30 Minuten auf dem Taumler mit o-Dianisidin/H₂O₂-Substrat inkubiert. Zehn Minuten nach Stoppen der Enzymreaktion mit 5 n HCl wurde der Substratumsatz bei 400 nm photometrisch bestimmt. Es wurde nun diejenige Konjugat-Verdünnung eingesetzt, die in Ver-

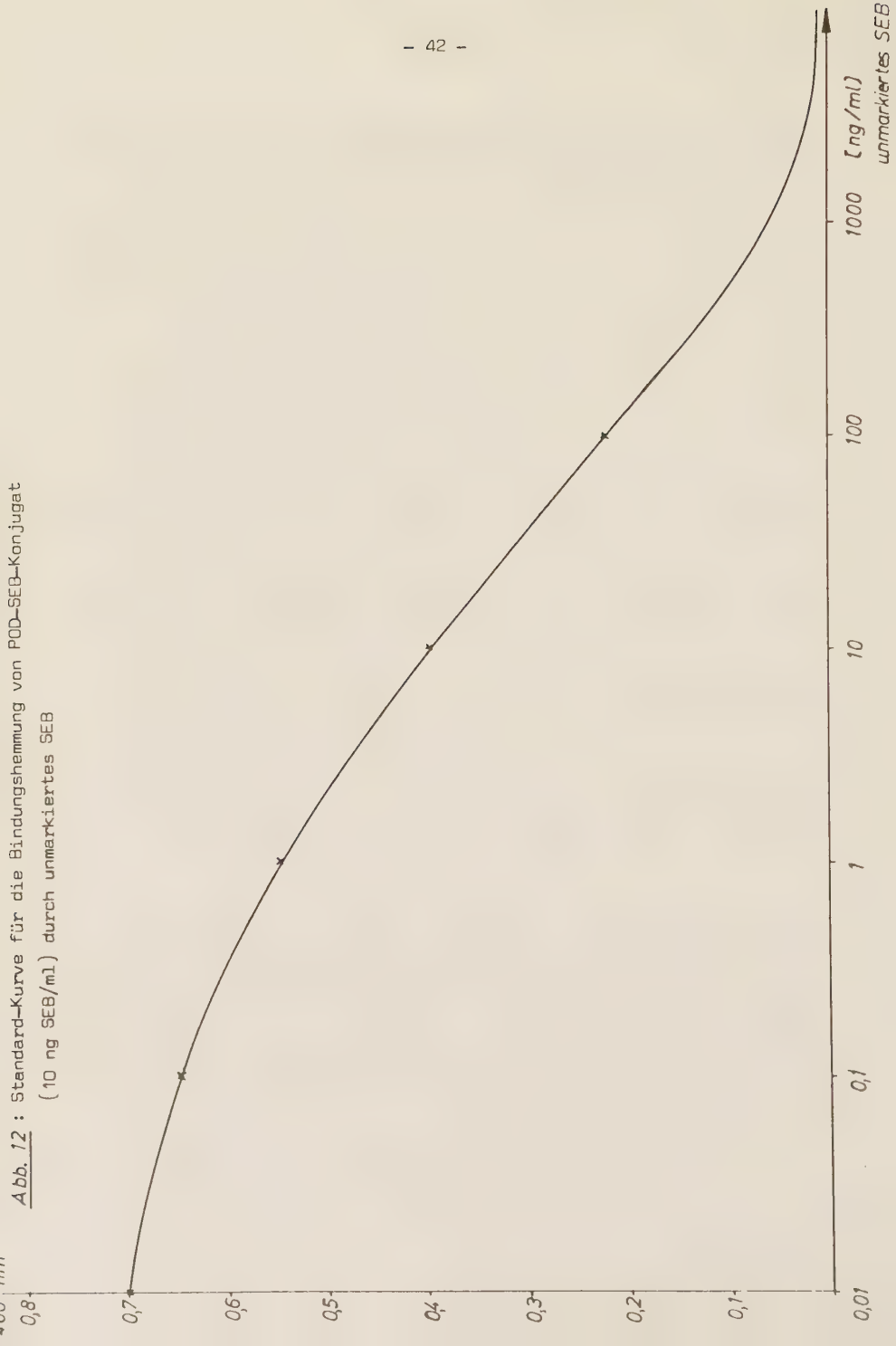
bindung mit 0,5 ml PBS den höchsten Substratumsatz bewirkt hatte. Von dieser optimalen Verdünnungsstufe wurde nun eine größere Menge als Arbeitslösung hergestellt.

Im nächsten Untersuchungsgang wurden jeweils 0,5 ml unmarkiertes SEB der zuvor beschriebenen SEB-Standard-Verdünnungen und anschließend 0,5 ml der Konjugat-Arbeitslösung in die antikörperbeschichteten Röhrchen pipettiert. Auf diese Weise wurden alle SEB-Standard-Verdünnungen in den verschiedenen Lösungsmitteln zusammen mit Konjugat inkubiert. Die Reaktionszeit betrug hierfür 30 Minuten, die Waschvorgänge und die Inkubation mit Substrat erfolgte wie zuvor beschrieben. Mit steigender Konzentration des unmarkierten Toxins in der Probe wird die Bindung von enzymmarkiertem Toxin zunehmend gehemmt, was in abnehmendem Substratumsatz meßbar ist. Mit diesen Meßwerten konnten dann Eichkurven für die verschiedenen SEB-Standardreihen aufgestellt werden (Abb. 12 zeigt eine dieser Eichkurven).

Um den Einfluß der Reaktionszeit bei gleichzeitiger Inkubation von freiem und markiertem SEB zu untersuchen, wurde die Standard-Toxin-Reihe mit SEB (Serva) in PBS verwendet. Standard-SEB und Konjugat-Arbeitslösung wurden wie zuvor in die wie beschrieben beschichteten Röhrchen pipettiert, nun aber verschieden lange (15, 30, 60 Minuten und 15 Stunden (über Nacht)) inkubiert und danach abgesaugt. Waschvorgänge und Inkubation mit Substrat waren unverändert.

Die Versuche hinsichtlich verschiedener Inkubationsarten umfaßten einerseits die Prüfung des kompetitiven Systems bei gleichzeitiger Inkubation von Probe und POD-SEB-Konjugat, andererseits getrennte Inkubation von Probe und POD-SEB-Konjugat (Zwei-Schritt-System). Außerdem wurde auch geprüft, ob bei den einzelnen Reaktionsschritten besser eine Inkubation im Wasserbad bei 37°C oder auf dem Taumler bei Zimmertemperatur vorzunehmen ist.

Abb. 12 : Standard-Kurve für die Bindungshemmung von POD-SEB-Konjugat
(10 ng SEB/ml) durch unmarkiertes SEB



Zur gemeinsamen Inkubation im kompetitiven System wurden jeweils 0,5 ml SEB-Standard und 0,5 ml Konjugat-Arbeitslösung in die anti-körperbeschichteten Röhrchen pipettiert und gemeinsam 30 Minuten auf dem Taumler bei Zimmertemperatur inkubiert. Das Zwei-Schritt-System wurde so geprüft, daß jeweils 0,5 ml SEB-Standard (Probe) und 0,5 ml PBS gemeinsam in einem Röhrchen 30 Minuten inkubiert, die Röhrchen dann abgesaugt und gewaschen wurden, um sie im nächsten Schritt mit 0,5 ml POD-SEB-Konjugat und 0,5 ml PBS für weitere 30 Minuten zu inkubieren. Die Bindung von Konjugat wurde bei beiden Inkubationssystemen über den schon beschriebenen Substratumsatz ermittelt.

Der Einfluß von Inkubation einiger oder aller Reaktionsschritte auf dem Taumler bei Zimmertemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C wurde so geprüft, daß SEB-Standard-Verdünnungen in antikörperhaltige Röhrchen pipettiert und gemeinsam mit 0,5 ml POD-SEB-Konjugat 30 Minuten entsprechend inkubiert wurden. Die nach Ablauf aller Reaktionsschritte erhaltenen Extinktionswerte wurden nun miteinander verglichen.

3.5.2.2 Untersuchungen zur Spezifität des Testes

Zu dieser Fragestellung wurden einerseits Untersuchungen mit anderen Enterotoxintypen, andererseits mit Protein A angestellt. SEA, SEC, SED und SEE wurden so in PBS verdünnt, daß Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 µg/ml erhalten wurden. Von Protein A wurden ebenfalls Verdünnungen in PBS hergestellt, die Konzentrationen von 100, 10, 1 und 0,1 µg/ml aufwiesen. Von diesen Enterotoxin- bzw. Protein-A-Verdünnungen wurden dann nacheinander jeweils 0,5 ml und 0,5 ml Konjugat-Arbeitslösung in ein antikörperbeschichtetes Röhrchen pipettiert. (Die hierfür verwendeten zwei SEB-Antiserum-Chargen stammten von verschiedenen Kaninchen, die aber gleichzeitig und mit derselben Charge SEB immunisiert worden waren.) Parallel dazu wurden Blindproben angesetzt, die kein freies Toxin, sondern nur

0,5 ml Konjugat und 0,5 ml PBS enthielten. Nach 30 Minuten Reaktionszeit erfolgten bei allen Proben, wie schon beschrieben, Waschen und Inkubation mit Substrat. Die Substratumsätze der Proben mit Zusatz von anderen Enterotoxintypen und Zusatz von Protein A wurden mit denjenigen der Blindproben verglichen, wobei der höchste Substratumsatz bei den sogenannten Blindproben erwartet wird.

Weiterhin wurde untersucht, ob und welchen Einfluß bakterizide Chemikalien wie Natriumazid und Merthiolat haben, deren Anwendung in einigen Testschritten wünschenswert ist. Für diese Untersuchungen sind folgende bakterizide Chemikalien bzw. Konzentrationen

- 0,1% Natriumazid,
- 0,02% Natriumazid,
- 0,02% Merthiolat oder
- 0,004% Merthiolat

zu je einer Probe von

- γ -Globulinlösung,
- BSA-Lösung oder
- SEB-Standard in PBS

zugemischt worden. Die übrigen Testbedingungen für den ELISA blieben unverändert. Der Einfluß dieser Reagenzien konnte dann durch die Substratumsätze der Probenröhrchen verglichen werden.

3.5.2.3 Untersuchungen zur Abstimmung der Reaktionspartner des Testsystems

Die Abstimmung der Reaktionspartner erstreckte sich immer sowohl auf Variationen der γ -Globulin-Konzentration als auch der Konjugat-Konzentration. So wurden beim Wechsel einer Antiserum-Charge im allgemeinen Röhrchen mit γ -Globulin-Konzentrationen von 2, 4, 5, 7,5 und 10 μ g Protein/ml hergestellt und mit der unter 3.5.2.1 beschriebenen SEB-Standard-Reihe und einer Konjugat-Arbeitslösung inkubiert. Bei Verwendung einer neuen oder einer für längere Zeit nicht benutzten Konjugat-Arbeitslösung wurde zunächst deren Enzymaktivität geprüft, dann Verdünnungsstufen mit PBS angelegt und jeweils 0,5 ml

Konjugat und 0,5 ml PBS mit einer beschichteten Röhrchen-Charge (meisten 5 μ g Protein/Röhrchen) inkubiert. Es wurde dann wieder diejenige Konjugat-Verdünnung gewählt, die zusammen mit 0,5 ml PBS (stellvertretend für eine Probe) die höchste Extinktion erreichte.

Nach Abstimmung des Testsystems erfolgten stets Kontrolluntersuchungen bezüglich der Reaktionszuverlässigkeit des Substrats: Maximaler Substratumsatz in Röhrchen mit 0,5 ml Konjugat der optimalen Verdünnungsstufe und 0,5 ml PBS; kein Substratumsatz in Röhrchen, die nur Substrat enthielten.

3.6 Ergebnisse

Zur Herstellung von SEB-Standard-Reihen waren PBS, pH 7,2, und 0,1 m Phosphatpuffer, pH 6,8, von den untersuchten Lösungsmitteln am besten geeignet. Sensitivität und Reproduzierbarkeit des Tests wurden durch die o.a. Lösungsmittel nicht beeinträchtigt. Sowohl 0,9% NaCl als auch 0,37% Brain Heart Infusion in 0,9% NaCl hemmten dagegen die Bindung von markiertem SEB geringfügig. Allerdings wirkte sich das nicht störend bei der Ermittlung der Toxingehalte an einer Standardkurve aus. Die Verwendung von 1% BSA in PBS als Lösungsmittel erhöhte zwar die Sensitivität des Tests, erwies sich aber als problematisch, geringe SEB-Mengen (ng-Bereich) aus BSA-haltiger Lösung ohne eklatante Transferierfehler weiterzuverdünnen. Selbst durch Pipettieren von großen Volumina (5 bzw. 10 ml) und sehr gutes Durchmischen der Proben konnten nur selten zufriedenstellende SEB-Standard-Reihen erhalten werden. Größere Streuungen der Meßergebnisse waren oftmals durch Verdünnungsfehler bedingt.

Die Untersuchungen bezüglich der Inkubationszeiten im kompetitiven Testsystem (gleichzeitige Inkubation von Probe und POD-SEB-Konjugat) zeigten, daß die Antigenbindung nach 15 Minuten etwa 80% von der nach 30 Minuten ermittelten ausmachte. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 1 bzw. 15 Stunden ergab nur noch eine Steigerung

der Antigenbindung von 5 bzw. 10% bezogen auf die Antigenbindung nach 30 Minuten. Deshalb wurde bei weiteren Untersuchungen im kompetitiven Testsystem die Inkubationszeit von SEB-Konjugat und Standard-Toxin bzw. von SEB-Konjugat und einer zu untersuchenden Probe auf 30 Minuten beschränkt.

Ein Vergleich im kompetitiven Testsystem zwischen gleichzeitiger Inkubation und dem Zwei-Schritt-System ergab bei gleichen SEB-Standard-Konzentrationen nahezu gleiche Bindung von POD-SEB-Konjugat. Da das Zwei-Schritt-System einen Waschvorgang mehr und die doppelte Inkubationszeit erfordert, wurde das kompetitive Testsystem mit gleichzeitiger Inkubation vorgezogen. Weitestgehende Reproduzierbarkeit von Ergebnissen im kompetitiven Testsystem ist nur bei Durchführung aller Inkubationsschritte auf einem Taumler gegeben. Alle anderen Inkubationsarten, wie Inkubation von Probe und Konjugat im Wasserbad mit nachfolgender Inkubation des Substrates auf dem Taumler bzw. Inkubation von Probe und Konjugat auf dem Taumler mit nachfolgender Inkubation des Substrates im Wasserbad als auch Inkubation von Probe und Konjugat wie Substrat im Wasserbad lieferten keine reproduzierbaren Meßwerte sowohl in Parallelansätzen als auch bei Wiederholungen. Bei Durchführung aller Inkubationsschritte auf dem Taumler wichen die Extinktionswerte bei 10 Versuchswiederholungen maximal 5% vom arithmetischen Mittel ab.

Von den zwei verwendeten Antiserum-Chargen, mit denen der Einfluß von Protein A und SEA, SEC, SED und SEE auf die Spezifität des kompetitiven ELISA untersucht wurde, zeigte die eine Charge sowohl bei Protein A als auch bei SEA, SEC, SED und SEE Bindungshemmungen, die andere nur bei Protein A.

Der ersten Antiserum-Charge wurde für diese Untersuchungen Protein A in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Bindung von SEB-Konjugat wurde dadurch so gehemmt, als wäre sie durch den Zu-

satz von SEB verursacht worden. Die Bindungshemmung durch verschiedene Protein-A-Konzentrationen an enzymmarkiertem SEB entsprach den folgenden SEB-Äquivalenten:

Protein A-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	100	10	1	0,1
Bindungshemmung entsprechend ng SEB	20	20	2	0,5

Der Grad der Bindungshemmung durch 1 $\mu\text{g/ml}$ der verschiedenen Enterotoxintypen ist in der folgenden Aufstellung wiedergegeben:

Enterotoxintyp	SEA	SEB	SEC	SED	SEE
Bindungshemmung	18%	98%	1%*	6%	15%

* nicht signifikant, da im Streuungsbereich

Die zweite, im Rahmen dieser Arbeit auch weiterverwendete Antiserum-Charge reagierte nicht mit den übrigen nicht homologen Enterotoxintypen SEA, SEC, SED und SEE, jedoch ebenfalls mit Protein A. Die Bindungshemmung von enzymmarkiertem SEB durch Protein A betrug - unabhängig von den untersuchten Protein A-Konzentrationen - etwa 6%.

Bei der Herstellung des Immunosorbens bewirkte der Zusatz von bakterizid wirkenden Chemikalien (Natriumazid, Merthiolat) zur γ -Globulin- und SEB-Standard-Lösung bei Konzentrationen von 0,1% Natriumazid bzw. 0,004% Merthiolat unspezifische Verringerungen des Substratumsatzes. Bei der BSA-Lösung zeigte nur der Zusatz von 0,004% Merthiolat diese Auswirkung. Alle verwendeten Lösungen zeigten bei Zusatz von Natriumazid in einer Konzentration von 0,02% keine negativen Auswirkungen. Zusammenfassend ergab sich, daß der Zusatz von Merthiolat in Konzentrationen ab 0,004% zu einem beliebigen Testschritt den ELISA beeinträchtigte, während 0,02% Natriumazid zu keiner Störung des ELISA führten.

Für die Abstimmung des Testsystems waren bei kurzen Reaktionszeiten und Verwendung des kompetitiven Prinzips mit gleichzeitiger Inkubation zweier konkurrierender Reaktionspartner folgende Gesichtspunkte maßgebend: Die zur Herstellung des Immunosorbens verwendeten γ -Globulin-Chargen mußten einen ausreichend hohen Anteil an spezifischen Antikörpern besitzen, was nur durch die Bindung von POD-SEB-Konjugat an die beschichteten Röhrchen festgestellt werden konnte, zumal der Gehalt an präzipitierenden SEB-Antikörpern in diesen Chargen nicht mit dem der im ELISA reagierenden Antikörper identisch war. Eine Erhöhung der Antikörperkonzentration im Röhrchen bedeutete einerseits vermehrte Bindung von enzymmarkiertem SEB, was sich dann durch hohe Extinktionswerte, und damit durch präzisere Wiedergabe der Bindungsverhältnisse zeigte, andererseits aber auch erhöhten Konjugatverbrauch bei gleichzeitiger Senkung der Sensitivität. Deshalb wurde die γ -Globulin-Konzentration meist auf maximal $5 \mu\text{g Protein/ml}$ festgelegt.

Die Konjugat-Lösung mußte so gewählt sein, daß nur die Zeit und die Antikörperkonzentration limitierende Faktoren für die Antigen-Antikörperbindung waren, d.h. das Konjugat mußte ohne Zugabe von freiem SEB innerhalb 30 Minuten die besetzbaren Antikörperbindungsstellen absättigen können. Dieser Überschuß an Konjugat durfte aber nicht höher als das Zweifache der Konzentration sein, die gerade die höchste Extinktion in 30minütiger Inkubation bewirkte, weil bei weiterer Erhöhung des Konjugates stets ein Bindungsabfall eintrat. Dieser sogenannte Sättigungsbereich der Antikörperbindungsstellen ist bei Verwendung kleiner Antikörperkonzentrationen geringer als bei großen und erfordert deshalb entsprechend genaue Abstimmung des Konjugates. Weiterhin wurde die Konjugatkonzentration so gewählt, daß keine Extinktion über ($E_{400 \text{ nm}}$) 2,2 nach Inkubation im beschichteten Röhrchen erreicht wurde, weil bei höheren Extinktionen kein linearer Zusammenhang mehr zwischen POD-Konzentration (hier vom enzymmarkierten SEB) und Substratumsatz besteht (siehe auch vergleichende Untersuchungen zum Substratumsatz durch POD, 3.1.2.1).

Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde das Testsystem in den meisten Fällen so abgestimmt, daß der Nachweisbereich von Enterotoxin B zwischen 0,1 und 1000 ng/ml lag.

3.7 Anwendung des ELISA zum Nachweis von Enterotoxin B in Lebensmittelextrakten

3.7.1 Material

Zur künstlichen Kontamination mit enterotoxinogenen Staphylokokken oder Toxin bzw. zur späteren Extraktion wurden folgende Lebensmittel verwendet: Pasteurisierte Milch, Vorzugsmilch und H-Milch mit jeweils 3,5% Fett sowie H-Milch mit 1,5% Fett, Dänischer Butterkäse mit 60% Fett i.T. und Edamer Käse mit 30% Fett i.T., Zungenwurst, Hackfleisch, Kochschinken und Salami. Zur Lebensmittelkontamination wurde einerseits der S. aureus Stamm 10-275 (USA Medical Research Institute of Infectious Diseases, Frederick/Maryland, Fort Detrick), andererseits reines SEB aus institutseigener Herstellung verwendet.

Zur Extraktion nach dem von REISER et al. (68) beschriebenen Verfahren wurden

Amberlite CG 50	} (Serva, Heidelberg)
Polyäthylenglykol 50% (Carbowax) Typ 20.000	
Visking Dialysierschlauch 8/32	
Trypsin, krist. pharm., salzfrei; 160 EU/mg	

und

Chloroform, 1 n bzw. 5 n HCl, 1 n bzw. 5 n NaOH, 0,005 m
Phosphatpuffer, pH 5,6,
PBS (0,015 m Phosphatpuffer, pH 5,9, mit 0,09% NaCl)
PBS (0,15 m Phosphatpuffer, pH 6,8, mit 0,9% NaCl)

verwendet.

3.7.2 Methodik

3.7.2.1 Herstellung von Lebensmittelextrakten

Zur Extraktion von Lebensmitteln wurden zwei verschiedene Verfahren in unterschiedlichem Umfang eingesetzt:

- A) Das vollständige, von REISER et al. (68) beschriebene Verfahren oder nur
- B) die drei ersten Extraktionsstufen dieses Verfahrens (Säurefällung, Chloroformextraktion, Säurefällung mit anschließender pH-Einstellung auf den Neutralbereich).

Wie bereits publiziert (77), waren zum Nachweis von SEB in Lebensmittelextrakten, die nach der vollständigen REISER-Methode aus künstlich kontaminierten Lebensmitteln gewonnen worden waren, keine Schwierigkeiten hinsichtlich eines empfindlichen und spezifischen Nachweises von 1 ng/ml Extrakt aufgetreten. Es sind im Rahmen dieser Arbeit nur solche Lebensmittelproben mit dem kompletten REISER-Verfahren extrahiert worden, denen zuvor SEB-bildende Staphylokokken zugesetzt worden waren.

In diesen Versuchen wurde zuvor *S. aureus* in BHI bebrütet, die Kultur zentrifugiert und das Staphylokokkensediment in BHI wieder aufgelöst, um somit dem Lebensmittel ein Inokulum ohne freies SEB zusetzen zu können. Da aufgrund von Vorversuchen geschätzt werden konnte, bei welchem Inokulum und unter welchen Bedingungen in den Lebensmitteln mit einer nachweisbaren Toxinproduktion gerechnet werden kann, wurden je nach Lebensmittel folgende Versuchsbedingungen gewählt:

- I. 100 ml pasteurisierter Milch wurden etwa 40×10^8 (kolonienbildende Einheiten) Staphylokokken (Keimzahlbestimmung im Koch'schen Plattenverfahren) zugesetzt, 90 Minuten bei 37°C inkubiert und extrahiert.
- II. a) 100 ml H-Milch wurden mit dem gleichen Inokulum wie unter I. beimpft, 15 Stunden bei 37°C inkubiert und danach extrahiert.
- II. b) 100 ml H-Milch wurden mit dem gleichen Inokulum wie unter I. beimpft, 15 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert und danach extrahiert.

- III. a) 100 ml H-Milch wurden mit dem gleichen Inokulum wie unter I. beimpft, 48 Stunden bei 37°C inkubiert und danach extrahiert.
- III. b) 100 ml H-Milch wurden wie unter I. beimpft, 48 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert und extrahiert.
- IV. a) 100 ml H-Milch wurden etwa 100×10^8 (kolonienbildende Einheiten) Staphylokokken zugesetzt, 48 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert und danach extrahiert.
- IV. b) 100 ml H-Milch wurden wie unter IV. a) beimpft, 48 Stunden bei 37°C inkubiert und danach extrahiert.
- V. 100 g Dänischer Butterkäse (60% Fett i.T.) wurde zerkleinert mit 24×10^9 Staphylokokken beimpft, unter Zusatz von 100 ml Aqua dest. homogenisiert und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Probe mit weiteren 50 ml Aqua dest. versetzt, homogenisiert und extrahiert.
- VI. 100 g zerkleinerter Edamer Käse (30% Fett i.T.) wurde wie unter V. beimpft, inkubiert und extrahiert.
- VII. 100 ml H-Milch wurden mit dem gleichen Inokulum wie unter V. und VI. beimpft, 48 Stunden bei 37°C inkubiert und danach extrahiert.
- VIII. 100 g Zungenwurst wurden mit 44×10^9 Keimen beimpft, mit 50 ml Aqua dest. homogenisiert und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Probe mit weiteren 180 ml Aqua dest. homogenisiert und extrahiert.
- IX. 100 g Hackfleisch (Inokulum wie unter VIII.) wurden unter Zusatz von 30 ml Aqua dest. homogenisiert, 24 Stunden bei 37°C inkubiert, danach mit 110 ml Aqua dest homogenisiert und extrahiert.

Von den Proben I - IX wurden Blindproben ohne Staphylokokkenzusatz mitgeführt.

Nach dem unter 3.7.2.1 (B) verkürzten Extraktionsverfahren sind Vorzugsmilch (3,5% Fettgehalt), H-Milch (1,5% und 3,5% Fettgehalt), Kochschinken und Salami (mittlere Qualität) extrahiert worden. Den Milch-

proben (100 ml), dem Kochschinken (100 g) und der Salami (100 g) ist jeweils in Parallelansätzen 1 ml SEB-Lösung mit Konzentrationen von 7,5, 0,75 bzw. 0,075 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt worden (Vorzugsmilch wurde vor Toxinzugabe aufgekocht). 100 g Kochschinken bzw. 100 g Salami wurden jeweils vor dem Zusatz von Toxin mit 200 ml Aqua dest. homogenisiert.

3.7.2.2 Nachweis von Enterotoxin B in Lebensmittelextrakten

Von allen Lebensmittelextrakten wurden jeweils 0,5 ml Extrakt und 0,5 ml POD-SEB-Konjugat (Arbeitslösung) in ein antikörperbeschichtetes Röhrchen pipettiert, das Röhrchen 30 Minuten auf dem Taumler inkubiert, abgesaugt, gewaschen und mit Substrat weitere 30 Minuten inkubiert. Parallel dazu wurde eine SEB-Standard-Verdünnungsreihe mitgeführt, indem jeweils 0,5 ml SEB-Standard und 0,5 ml POD-SEB-Konjugat in derselben Art und Weise behandelt wurden wie zuvor für die Lebensmittelproben beschrieben. Als Negativkontrollen dienen einerseits Probenröhrchen mit 0,5 ml POD-SEB-Konjugat und 0,5 ml PBS (höchste Extinktion), andererseits 0,5 ml POD-SEB-Konjugat und 0,5 ml Lebensmittelprobe ohne Toxinzusatz (meist etwas unter der höchsten Extinktion).

3.8 Ergebnisse

Die in den künstlich mit Staphylokokken kontaminierten und inkubierten Lebensmitteln nachgewiesenen SEB-Mengen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Aufgrund der begrenzten Anzahl der Untersuchungen läßt sich derzeit noch nicht sagen, welches der untersuchten Lebensmittel bei Anwesenheit von toxinogenen Staphylokokken unter definierten äußeren Bedingungen am ehesten eine Enterotoxinbildung begünstigt. Die nachgewiesenen und in Tabelle 3 aufgeführten Toxinmengen liegen zum größten Teil unter der Nachweisgrenze von üblicherweise angewandten Gelpräzipitationsmethoden, aber im für den Menschen toxischen Bereich.

Tabelle 3: Nachweis von SEB mittels ELISA nach vorausgegangener Extraktion aus künstlich mit Staphylokokken kontaminierten und inkubierten Lebensmitteln

Art des Lebensmittels	Inokulum ^(*) /100 g bzw. 100 ml Lebensmittel	Inkubation Dauer/Temperatur	nachgewiesenes Gesamt-SEB ^(*) in 100 g bzw. 100 ml Lebensmittel
Pasteurisierte Milch [*]	40 x 10 ⁸	90 Min./37°C	129 ng
H-Milch [*]	40 x 10 ⁸	15 Std./37°C	160 ng
H-Milch [*]	40 x 10 ⁸	15 Std./Zimmertemp.	100 ng
H-Milch [*]	40 x 10 ⁸	48 Std./Zimmertemp.	231 ng
H-Milch [*]	40 x 10 ⁸	48 Std./37°C	264 ng
H-Milch [*]	100 x 10 ⁸	48 Std./Zimmertemp.	306 ng
H-Milch [*]	100 x 10 ⁸	48 Std./37°C	394 ng
Dänischer Butterkäse ^{**}	24 x 10 ⁹	48 Std./37°C	186 ng
Edamer ^{***}	24 x 10 ⁹	48 Std./37°C	186 ng
H-Milch [*]	24 x 10 ⁹	48 Std./37°C	258 ng
Zungenwurst	44 x 10 ⁹	24 Std./37°C	249 ng
Hackfleisch	44 x 10 ⁹	24 Std./37°C	177 ng

* 3,5% Fettgehalt

** 60% Fett i.T.

*** 30% Fett i.T.

(*)
(*)(*)

kolonienbildende Einheiten an S. aureus
Gesamt-SEB jeweils in 3 ml aufgelöstem Extrakt-
Lyophilisat nachgewiesen

Bei der Untersuchung der nach REISER et al. (66) extrahierten Proben waren keine Störfaktoren für den ELISA festzustellen.

Bei Verwendung des abgekürzten Extraktionsverfahrens (3.7.2.1) sind teilweise sehr unterschiedliche SEB-Quantitäten aus derselben Lebensmittelart bei zwei Proben unterschiedlicher Herkunft mit gleichen SEB-Zugaben nachgewiesen worden. Die jeweiligen Recovery-Raten gehen aus Tabelle 4 hervor. Es kann gezeigt werden, daß mit dem ELISA in jedem Fall in dem künstlich mit $0,75 \mu\text{g}$ SEB kontaminierten Lebensmittel nach Toxin nachgewiesen werden konnte. Bei Zugabe von $0,075 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ bzw. 100 ml Lebensmittel war dies nur in drei von zehn untersuchten Proben möglich.

Tabelle 4: Nachweis von SEB in künstlich mit dem Toxin kontaminierten Lebensmitteln
bei Verwendung eines verkürzten Extraktionsverfahrens

		SEB-Recovery (μg) bei Extraktion von				
		Vorzugsmilch*	H-Milch*	H-Milch**	Salami	Kochschinken
Zusatz von SEB zu 100 g bzw. 100 ml Lebens- mittel	7,5 μg	2,7 5,6	5,4 4,6	6,2 1,8	6,3 6,8	0,1 6,7
	0,75 μg	0,12 0,35	0,45 0,32	0,42 0,25	0,065 0,13	0,065 0,35
	0,075 μg	neg. 0,003	0,06 neg.	0,068 neg.	neg. neg.	neg. neg.

* 3,5% Fettgehalt

** 1,5% Fettgehalt

4. Diskussion

Als mit diesen Untersuchungen begonnen wurde, waren zum Enterotoxin-nachweis in Lebensmitteln hauptsächlich Gelpräzipitationsmethoden als relativ zuverlässige Nachweisverfahren bekannt, deren Nachteile meist lange Inkubationszeiten sind und die insbesondere langwierige Extraktions-, Reinigungs- und Konzentrierungsverfahren voraussetzen. Es erschien daher sinnvoll, zu prüfen, ob mittels ELISA-Prinzip, das auf anderen Gebieten mit gutem Erfolg eingesetzt worden war, nicht eine Alternative zum ebenfalls als Enterotoxinnachweis eingesetzten Radioimmunoassay entwickelt werden könnte. Mit dem Ersatz eines radioaktiven Labels durch ein Enzym könnte ein Test erarbeitet werden, der auch für weniger finanzkräftige Institutionen, vor allem aber unabhängig von einem Speziallabor, das den Sicherheitsbestimmungen zum Arbeiten mit radioaktiven Stoffen entsprechen muß, durchführbar wäre. Für das schnelle, quantitative und materialsparende ELISA-Prinzip wird an größeren Geräten lediglich ein Spektralphotometer benötigt.

Weiterhin zeigte sich, daß bei Anwendung des Solid-Phase-Radioimmunoassays zum Enterotoxinnachweis in Lebensmitteln, sofern gute Reproduzierbarkeit und Sensitivität erreicht werden sollten, nicht auf eine Lebensmittelextraktion verzichtet werden kann und eine lange Testzeit (24 Std.) benötigt wird. Deshalb war das besondere Anliegen bei der Entwicklung der in dieser Arbeit beschriebenen Methode, die Reaktionszeiten zu minimieren und auch bei Verzicht auf eine Konzentrierung von Lebensmittelextrakten noch ausreichende Nachweisempfindlichkeit zu erreichen. Die Beeinflussbarkeit der Faktoren Zeit und Sensitivität mußte daher von der Auswahl der Substrate bis zur Abstimmung des gesamten Testsystems berücksichtigt werden.

Nach vergleichenden Untersuchungen zur Substratauswahl (3.1.2.1) waren ABTS und o-Dianisidin die empfindlichsten Chromogene und ge-

eignet, noch sehr kleine POD-Mengen nachzuweisen, so daß sie in die engere Wahl kamen. Wie aus den Abbildungen 2 und 3 hervorgeht, verläuft der Substratumsatz bei kontinuierlicher Messung über eine halbe Stunde bei diesen beiden Substraten scheinbar einer Exponentialfunktion entsprechend.

Da Substratumsätze im allgemeinen dann am besten gemessen werden, wenn die Extinktionsänderung ($\Delta E/\text{Min.}$) über längere Zeit konstant ist und ΔE nur dann nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz proportional der Konzentration des umgesetzten Substrates und damit auch der POD-Menge ist, die diesen Substratumsatz bewirkt hat, schien keines der beiden Substrate dieser Forderung gerecht zu werden. Da sich aber der Substratumsatz von o-Dianisidin nach Verwendung eines Stop-Reagenzes für POD-Mengen von 0,2 - 0,8 ng (Messung des Substratumsatzes nach 30minütiger Reaktionszeit) dann doch der POD-Menge proportional erwies, wurde das o-Dianisidin für die weiteren Nachweise von POD vorgezogen. Das leichte Ausfallen des umgesetzten o-Dianisidins aus der Lösung erwies sich nach Zusatz von Stop-Reagenz als reversibel. Durch den Stop-Vorgang wurde offensichtlich keine unspezifische Reaktion hervorgerufen, da bei weiterer Erhöhung der POD-Konzentration ($> 0,8 \text{ ng}$) bzw. wesentlicher Verlängerung der Reaktionszeit trotz Verwendung von Stop-Reagenz der Substratumsatz nicht mehr einer Geraden entspricht, sondern einer Exponentialfunktion folgt. Dies deutet darauf hin, daß unter diesen Bedingungen kein der POD-Menge proportionaler Substratumsatz mehr abläuft und der verminderte Umsatz vermutlich durch eine Substrat-Enzymhemmung bedingt ist (entweder Hemmung durch das umgesetzte Substrat oder Hemmung durch Mangel an umsetzbarem Substrat).

In Vorversuchen konnte darüber hinaus ermittelt werden, daß auch bei extremem POD-Überschuß vermindelter o-Dianisidin-Umsatz erfolgt und sogar total gehemmt werden kann. Weitere Untersuchungen zur Enzymkinetik sind aus praktischer Sicht nicht erforderlich gewesen.

Bei ABTS ergab sich nach den beschriebenen Versuchsbedingungen kein linearer Zusammenhang zwischen POD-Konzentration und Substratumsatz, was aber nicht generell besagt, daß man dieses Substrat im ELISA nicht verwenden sollte. Dabei müßte aber berücksichtigt werden, daß bei Verwendung von 0,4 mM ABTS, wie dies in den vergleichenden Untersuchungen der Fall war, im ELISA Kurvenbilder (Darstellung der Bindungshemmung von enzymmarkiertem Toxin durch freies Toxin) zu erwarten sind, die je nach SEB-Konzentration nicht nur durch den Grad der Hemmung durch freies Toxin, sondern auch durch die bereits angesprochenen enzymkinetischen Beziehungen bestimmt sind. Die Berechnung des gebundenen enzymmarkierten Toxins wäre damit fehlerhaft.

Trotz der in diesem Zusammenhang mit ABTS gewonnenen Erkenntnisse ist nicht ausgeschlossen, daß durch Variation der Molarität und des Peroxid-Gehaltes Bedingungen gefunden werden könnten, die den Einsatz von ABTS zum exakten POD-Nachweis rechtfertigen.

Bei Verwendung des o-Dianisidins sind die Kurvenbilder (Hemmung von POD-SEB-Konjugat durch SEB) nur durch die Bindungsaffinität und durch bindungskinetische Merkmale der Reaktionspartner bestimmt, vorausgesetzt, man reguliert die POD-SEB-Konjugate bei der Inkubation im ELISA so, daß keine Extinktionen über 2,2 im Substratumsatz resultieren.

Für automatisierte gleichzeitige Messungen großer Probenmengen (70) wäre das empfindlichere ABTS, das dann nicht stabilisiert werden müßte, eventuell dem o-Dianisidin vorzuziehen. Wenn aber mit begrenzten Probenzahlen (~200/Tag) gearbeitet wird und nur ein Photometer mit wenigen Meßplätzen zur Verfügung steht, oder die Proben eventuell sogar aus arbeitstechnischen Gründen erst an dem der Untersuchung folgenden Tag gemessen werden können, bietet das o-Dianisidin die bessere Handhabung, zumal es mit sehr geringem Aufwand stabilisiert werden kann. Diese Möglichkeit der raschen Stabilisierung vieler

Proben bei geringer Zeitverschiebung ist ein enormer Vorteil gegenüber der komplizierteren Stabilisierung bei Verwendung von ABTS.

Die übrigen Substrate haben den in dieser Arbeit gestellten Anforderungen nicht genügt, was ihre Anwendung bei weniger auf Empfindlichkeit ausgerichteter Zielsetzung aber nicht von vornherein ausschließt.

In den nach AVRAMEAS und TERNYNCK (3) durchgeführten Kopplungsversuchen ergaben sich hinsichtlich der Glutaraldehyd-Konzentration dahingehend Abweichungen, als nicht bestätigt werden konnte, daß sich POD bei den angegebenen Versuchsbedingungen mit Glutaraldehyd verbindet, ohne Polymere zu bilden. Die starke Bildung unterschiedlicher Polymere (Abb. 9) bei der von AVRAMEAS und TERNYNCK beschriebenen Methode beruht vermutlich nicht nur auf dem Mengenverhältnis von Glutaraldehyd zu Protein, sondern auch auf dem Reaktionsvolumen. Darauf deuten eigene Untersuchungen hin, in denen einmal 10 mg POD in 0,3 ml Glutaraldehydlösung und ein anderes Mal dieselbe Menge POD in 1 ml derselben Gesamtmenge an Glutaraldehyd aktiviert wurden. Im ersten Fall entstanden verschiedene hochmolekulare POD-Polymere, im zweiten Fall dagegen kaum.

Es wird derzeit eine Vielfalt an Reaktionsmöglichkeiten der Glutaraldehydmoleküle diskutiert (66). Über die Bindungsmechanismen im einzelnen und über die stöchiometrischen Parameter dieses Kopplungsreagenzes ist noch nichts Definitives bekannt. Es konnte jedoch durch Hydrolyse von aktiviertem Protein und quantitativer Aminosäurenanalyse (66) festgestellt werden, daß bei Kopplung von Proteinen mittels Glutaraldehyd fast ausschließlich das Lysin reagiert. Diese Feststellung und die Kenntnis, daß SEB am C-Terminal Lysin mit einer sehr reaktiven α -Aminogruppe besitzt, ließen mit großer Wahrscheinlichkeit eine Kopplung von POD an SEB mittels Glutaraldehyd als möglich erscheinen. Mit den unter 3.1.2.3 angegebenen Versuchsbedingungen war es möglich, POD und SEB im molaren Verhältnis 1:1

zu koppeln. Eine bessere Ausbeute an Kopplungsprodukt bei weniger freiem ungekoppelten SEB (siehe auch Abb. 10) läßt sich sicher noch erreichen, indem die schon beschriebenen Verluste von aktivierter POD durch Reduzierung der SEB-Zugabe oder durch Erhöhung der aktivierten POD ausgeglichen werden. Das nicht gekoppelte SEB konnte allerdings nach gelchromatographischer Abtrennung mittels Ultrafiltration konzentriert und wiederverwendet werden. Über die quantitativen Verhältnisse der Kopplung von POD an SEB nach einer anderen (61) als der hier verwendeten Kopplungsmethode wird leider nichts berichtet (42).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Kopplungsprodukte wurden nach chromatographischer Auftrennung und Konzentrierung (Ultrafiltration) jeweils mit Einmalfiltern sterilfiltriert. Dabei blieb ein erheblicher Teil des Kopplungsproduktes im Sterilfilter zurück, eine Beobachtung, die auch schon bei anderen hochmolekularen Substanzen gemacht worden war. Dieser Verlust war nicht etwa durch das Totvolumen des Filters, sondern vermutlich durch Adsorption an die Filtermembran bedingt. Ein Nachspülen des Filters mit Puffer war zum einen wenig effektiv, zum anderen war die Vermehrung des Volumens im vorliegenden Fall nicht wünschenswert, da die POD-Aktivität bei Lagerung in schwächerer Konzentration erfahrungsgemäß stärker abnimmt als in größerer. Da der Zusatz von Natriumazid bzw. Merthiolat zum konzentrierten Kopplungsprodukt wegen der Gefahr der POD-Inaktivierung nicht empfehlenswert ist, muß noch geprüft werden, ob für Sterilfiltration kleinerer Volumina künftig nicht eine bessere Methode angewandt werden kann.

Bei der Herstellung des Immunosorbens zeigte sich, daß die Proteinadsorption durch Erhöhung der Proteinkonzentration (bis zu $10 \mu\text{g/ml}$) der zur Inkubation verwendeten γ -Globulin-Lösung gesteigert werden konnte (Abb. 11), während die Proteinadsorption bei weiterer Erhöhung wieder abnahm. Ähnliche Ergebnisse haben auch schon andere (36) beschrieben und dieses Phänomen damit erklärt, daß zwar bei Inkubation

mit hohen Proteinkonzentrationen zunächst auch entsprechend viel an Polystyren adsorbiert wird, sich aber sehr bald ein Gleichgewicht zwischen den adsorbierten und den frei in der Lösung vorliegenden Molekülen einstellt. Dieser Vorgang vollzieht sich auch im zweiten Inkubationsschritt, in dem das Immunosorbens mit Antigen inkubiert wird und die adsorbierten Proteinmengen nachgewiesen werden, so daß bei im ersten Schritt erzielter hoher Proteinadsorption auch entsprechend viel im zweiten Inkubationsschritt abgelöst wird.

In eigenen Untersuchungen ließ sich bei extremem Proteinangebot in der zur Herstellung des Immunosorbens verwendeten Inkubationslösung (z.B. 100 $\mu\text{g/ml}$) wieder eine Erhöhung der Proteinadsorption erreichen. Da die Adsorptionsrate bei Verwendung von 100 $\mu\text{g/ml}$ γ -Globulin-Protein lediglich so groß war wie bei 2,5 $\mu\text{g/ml}$, hat die Verwendung so hoher Proteinkonzentrationen jedoch keine praktische Bedeutung.

Sowohl im ELISA als auch im Solid-Phase Radioimmunoassay werden mit gutem Erfolg Carbonat-Puffer bzw. PBS zur Globulinadsorption an Polystyren verwendet. Diese beiden Puffer werden von verschiedenen Autoren mit teilweise geringfügigen Abweichungen hinsichtlich Molaritäten und pH-Werten beschrieben. Dabei geht aus diesen Publikationen nicht hervor, inwieweit experimentelle Daten zugrunde lagen.

Da sich in den eigenen Untersuchungen zur Proteinadsorption an Polystyren der PBS-Puffer (0,015 m Phosphatpuffer, 0,15 m NaCl) deutlich positiv gegenüber dem Carbonat-Bicarbonatpuffer abhob (siehe auch Abb. 11), wurde nicht weiter untersucht, ob durch Änderung der Molarität bzw. des pH-Wertes eine Steigerung der Adsorption an dieses Trägermaterial zu erreichen ist.

Wie aus Untersuchungen anderer Autoren (37) hervorgeht, haben auch die Art des später zur Inkubation von Immunosorbens und Antigen verwendeten Lösungsmittels und dessen pH-Wert einen Einfluß auf die

Bindungsbeständigkeit der adsorbierten Proteinmenge. So wurden nach einer 16stündigen Inkubation mit PBS-Puffer, der einen pH-Wert um den Neutralpunkt herum hatte, nur 20 - 30% des adsorbierten Proteins wieder vom Polystyren abgelöst, während im stark sauren bzw. alkalischen Bereich bis zu 73% abgelöst wurden. Welchen Einfluß der Zeitfaktor bei diesen Untersuchungen hatte, wurde nicht erörtert.

Den Einfluß der Inkubationszeit auf die Bindung von Immunglobulin an Polystyren haben ENGVALL et al. (37) untersucht und berichtet, daß beispielsweise nach einer 3stündigen Inkubation bei 37°C 60% des maximal adsorbierbaren Immunglobulins (gelöst in 0,1 m Natriumcarbonatpuffer, pH 9,8) an Polystyren gebunden worden waren und diese Rate als zufriedenstellend gelten kann.

In eigenen Untersuchungen (γ -Globulin in PBS, pH 7,2) wurde nach 3 Stunden bei 37°C im Wasserbad 90% des bei einer 15stündigen Inkubationszeit (Zimmertemperatur) gebundenen Immunglobulins adsorbiert, so daß eine Verlängerung der Inkubationszeit nicht sinnvoll wäre. Bei diesem Vergleich wurde die 15stündige Inkubationszeit bei 37°C im Wasserbad nicht mit berücksichtigt, da hierbei keine gleichmäßige Adsorption an Polystyren festzustellen war.

Bei orientierenden Versuchen zur Anwendung des ELISA an SEB-Standards konnte festgestellt werden, daß Pipettierfehler beim Anlegen von SEB-Standard-Verdünnungen einen wesentlichen Störfaktor darstellen können. Diese Pipettierfehler traten vor allem bei Verwendung von BSA-Lösung als Verdünnungsflüssigkeit auf. Dadurch deutete sich schon an, daß es eventuell auch sehr schwierig sein könnte, beispielsweise brauchbare SEB-Standard-Verdünnungen mit toxinfreien Lebensmittelextrakten herzustellen. Solche mit Lebensmittelextrakten hergestellte SEB-Standard-Verdünnungen wären aber durchaus wünschenswert, da sie adäquatere Standard-Kurven vermitteln würden als mit Puffer angelegte Verdünnungsreihen. Dies wäre allerdings auch nur dann der Fall, wenn

von jeder zu untersuchenden Lebensmittelart toxfreie Standard-extrakte zur Verfügung stehen würden, die in ihrer Zusammensetzung der zu untersuchenden fraglichen Probe gleichzusetzen wären. Da diese Forderung wohl kaum zu erfüllen ist, muß man in Kauf nehmen, daß die Berechnung von SEB-Gehalten in fraglichen Extrakten aufgrund von SEB-Standard-Kurven, die mit SEB in Puffer ermittelt wurden, teilweise mit geringfügigen Fehlern behaftet sind.

Wie schon unter 3.6 beschrieben, waren bereits nach 15minütiger Inkubation von SEB-Konjugat mit dem Immunosorbens 80% des bei der 30minütigen gebunden. Durch Verlängerung der Inkubationszeit über 30 Minuten hinaus konnte keine wesentliche Zunahme der Antigenbindung mehr beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, daß die Antikörperbindungsstellen in den gewählten Versuchsbedingungen nach 30 Minuten Inkubation nahezu besetzt waren.

Hinsichtlich der Frage, welches Testsystem am zweckmäßigsten anzuwenden sei, hat sich gezeigt, daß das kompetitive mit gleichzeitiger Inkubation von Probe und POD-SEB-Konjugat dem Zwei-Schritt-System durch Zeit- und Arbeitersparnis überlegen und außerdem gleich empfindlich ist. Ein weiterer Vorteil gegenüber dem Zwei-Schritt-System besteht darin, daß der Nachweisbereich (100% bis 0% Bindungshemmung von enzymmarkiertem SEB) bei gleichzeitiger Inkubation größer ist als im Zwei-Schritt-System. Während unter gleichen Konzentrationsverhältnissen der Reaktionspartner im Zwei-Schritt-System beispielsweise schon 100% Bindungshemmung von POD-SEB-Konjugat bei Anwesenheit von 10 bis 50 ng/ml freien Toxins eintritt, ist dies bei gleichzeitiger Inkubation erst bei 1 bis 5 µg/ml der Fall. Das bedeutet, daß beispielsweise bei Anwesenheit von 100 ng/ml SEB in einer Probe im Zwei-Schritt-System eine 100%ige Bindungshemmung hervorgerufen wird, und zur quantitativen Toxinermittlung nochmals Verdünnungsstufen angelegt werden müßten und eine Wiederholung des Tests erforderlich wäre. Das in der eigenen Arbeit verwendete Testsystem zeigt

diesen Nachteil nicht, erfordert allerdings eine genauere Abstimmung von Antikörper und enzymmarkiertem Antigen als das Zwei-Schritt-System.

Die in dieser Arbeit untersuchten Immunglobulin-Chargen zeigten unterschiedliche Reaktionen mit heterologen SE-Typen bzw. mit Protein A, obgleich die zwei Kaninchen, von denen die Antiseren stammten, mit derselben SEB-Charge unter gleichen äußeren Bedingungen immunisiert worden waren. Im einen Fall traten sowohl Kreuzreaktionen mit heterologen SE-Typen als auch mit Protein A auf. Die Bindungshemmung sowohl durch heterologe SE-Typen (außer SEC) als auch durch Protein A war konzentrationsabhängig. Im zweiten Fall reagierte die Antiserum-Charge nicht mit heterologen SE-Typen, aber mit Protein A, und zwar unabhängig von der Protein A-Konzentration. Die ausgewählten Protein A-Konzentrationen (0,1, 1 ... 100 $\mu\text{g/ml}$) bewirkten immer gleiche Bindungshemmungen von 6%, was einem SEB-Äquivalent von 0,1 ng/ml entsprach.

Im Gelpräzipitationstest (DOUCHTERLONY) zeigten sich bei beiden Antiserum-Chargen weder mit heterologen SE-Typen noch mit Protein A Kreuzreaktionen, so daß diese Methode als Kontroll-Test den ELISA nicht ersetzen kann.

Die Bindung zwischen spezifischem SE-Antiserum und Protein A führte auch bei der Immunofluoreszenz (43, 44) im SE-Nachweis zu Störungen. Diese unspezifische Reaktion wurde als Bindung zwischen dem Fc-Teil des γ -Globulins und dem Protein A erkannt. Es wurde weiterhin festgestellt, daß SEC mit spezifischem Anti-SEB eine Kreuzreaktion eingehen kann (9), während dies offensichtlich zwischen anderen heterologen SE-Typen und Anti-SEB nicht der Fall ist.

Da in der einen Antiserum-Charge sowohl relativ starke Kreuzreaktionen zwischen Anti-SEB einerseits und SEA, SEE und Protein A (in Ab-

hängigkeit von der Konzentration) andererseits auftraten und die Ursache dafür nicht in einer möglichen Verunreinigung des zur Immunisierung verwendeten Antigens zu suchen ist, muß die Möglichkeit einer Infektion des betreffenden Kaninchens mit enterotoxinogenen Staphylokokken zu irgendeinem Zeitpunkt in Betracht gezogen werden. Dafür scheint auch zu sprechen, daß die zweite Antiserum-Charge (anderes Kaninchen mit gleichem Antigen unter gleichen äußeren Bedingungen immunisiert) im ELISA keinerlei Kreuzreaktionen mit heterologen SE-Typen zeigte und mit Protein A (Konzentrationen zwischen $0,1 \mu\text{g}$ und $100 \mu\text{g/ml}$) immer den gleichen Grad an Bindungshemmung bewirkte. Diese gleichbleibende 6% Bindungshemmung, die $0,1 \text{ ng/ml}$ SEB-Äquivalent entspricht, beruht vermutlich allein auf der unspezifischen Bindung zwischen dem Fc-Teil der als Immunsorbens vorliegenden γ -Globulin-Moleküle und dem Protein A, wobei dann anzunehmen ist, daß bereits durch $0,1 \mu\text{g}$ Protein A/ml diese Bindungsstellen unter den gegebenen Bedingungen abgesättigt waren.

Limitierender Faktor wäre dabei nach dieser Theorie lediglich die γ -Globulinkonzentration gewesen. Die von der Protein A-Konzentration abhängige Bindungshemmung jedoch beim γ -Globulin des ersten Kaninchens, die minimal $0,5 \text{ ng SEB/ml}$ und maximal 20 ng SEB/ml entsprach, dürfte deshalb nur mit der Anwesenheit von spezifischen Anti-Protein A γ -Globulinmolekülen zu erklären sein.

Ausgehend von der Erkenntnis, daß die Spezifität eines Antiserums nicht durch den Gelpräzipitationstest garantiert werden kann, bleibt nur die Überprüfung im ELISA anhand von entsprechenden Standards. Seren mit unspezifischen Reaktionen gegenüber heterologen SE-Typen und verschieden starker Reaktion mit verschieden hohen Protein A-Konzentrationen sollten von vornherein für die Verwendung im ELISA ausscheiden, während Antiseren, die konstante Reaktion bzw. Bindungshemmung von SEB durch verschieden starke Protein A-Konzentrationen zeigen, ohne weitere Behandlung verwendet werden können. In diesem Zusammenhang stellt sich natürlich die Frage, ob und in welchem

Umfang denn überhaupt mit der Anwesenheit von Protein A beispielsweise in Lebensmittelextrakten zu rechnen ist.

Fast alle routinemäßig untersuchten *Staphylococcus aureus*-Stämme sind nach entsprechenden Berichten (43) Protein A-Bildner. Es wurde weiterhin festgestellt, daß etwa 98,9% der Koagulase- und DNase-positiven Stämme extrazelluläres Protein A bildeten, und zwar in einer Größenordnung von 2,8 bis 720 ng/ml Kulturflüssigkeit (10^9 Keime/ml). Aufgrund dieser Untersuchungen ist wahrscheinlich auch bei einer entsprechenden Vermehrung von enterotoxinogenen Staphylokokken im Lebensmittel mit Protein A-Mengen zu rechnen, die im ELISA bei der quantitativen SEB-Bestimmung stören könnten. Wenn unter den Bedingungen wie in dieser Arbeit bei der Untersuchung von Lebensmittelextrakten gearbeitet wird, sind die Werte anhand von Standard-Kurven ermittelter SEB-Gehalte lediglich durch Abzug des SEB-Äquivalentes, das der 6%igen Protein A-Hemmung entspricht, zu korrigieren. Eine andere Möglichkeit, Fehler der quantitativen SEB-Ermittlung im Lebensmittelextrakt wegen unspezifischer Bindung des Protein A mit SEB-spezifischem Antikörper zu verhindern, wäre die Behandlung des entsprechenden Extraktes mit Trypsin, da Protein A Trypsin-empfindlich ist (64).

Inwieweit aber durch diese enzymatische Behandlung des Extraktes das darin enthaltene Toxin speziell in seiner serologischen Aktivität im ELISA beeinflußt werden kann, bliebe noch erst zu prüfen.

Unspezifische Bindung zwischen Protein A und dem spezifischen Anti-SEB γ -Globulin könnte weiterhin ausgeschaltet werden, indem der für diese Bindung verantwortliche Fc-Teil des γ -Globulin-Moleküls enzymatisch abgespalten würde. Die Spezifität der Antiseren ließe sich außerdem noch verbessern, indem die Immunisierung an SPF-Kaninchen vorgenommen und allgemeine sowie lokale (Impfstelle) Staphylokokken-Infektionen, welche die Produktion spezifischer

Antiseren erheblich stören können, ausgeschaltet würden oder die präzipitierten Immunglobuline affinitätschromatographisch gereinigt würden.

Im Rahmen dieser Arbeit waren derartige, teilweise aufwendige, Verfahren nicht erforderlich.

Für die Anwendung des ELISA zum Toxinnachweis in Lebensmitteln war nach eigenen Untersuchungen vor dem eigentlichen Test eine kurze Extraktion (weitestgehende Eliminierung von unspezifischen und adsorptiv wirkenden Lebensmittelproteinen und Fetten durch Säurefällung und Chloroformextraktion) notwendig. Die Ergebnisse von SAUNDERS und BARTLETT (73), die mit Homogenisieren und Zusatz von Tween 80 bei der Vorbereitung der Lebensmittelproben auskommen, ohne unspezifische Reaktionen zu bekommen, konnten nicht bestätigt werden. Allerdings unterscheidet sich das dort angewandte Nachweisverfahren (Doppelantikörpertechnik) von dem hier angewandten.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte ELISA hat sich bisher als geeignet erwiesen, um mit mindestens gleicher Sensitivität wie der Radioimmunoassay SEB in Lebensmitteln nachzuweisen. Lediglich bei der Untersuchung von Kochschinken und nicht homogenisierter Milch (Vorzugsmilch) konnten nur geringe Mengen des künstlich zugesetzten SEB wiedergefunden werden. Dies dürfte allerdings nicht auf das ELISA-Prinzip selbst zurückzuführen sein. Es wird vielmehr aufgrund anderer Untersuchungen (47) mit vermehrter Adsorption von SEB an Protein bzw. an Fett zu rechnen sein, wodurch damit ein großer Teil des Toxins während der Extraktion verlorengeht und im Extrakt nicht mehr nachweisbar ist.

Zur Eliminierung störender Faktoren im Lebensmittelextrakt könnten proteolytische und lipolytische Enzyme eingesetzt werden, was, soweit es Proteasen betrifft, jedoch eine Inaktivierung vor dem Ansatz des Extraktes im ELISA voraussetzt.

Mit dem ELISA zum SEB-Nachweis ist ein Test entwickelt worden, der ausreichend sensitiv ist sowie zeit- und materialsparend eingesetzt werden kann. Mit diesen Untersuchungen sind wesentliche Voraussetzungen geschaffen worden, den ELISA zum Nachweis der anderen SE-Typen auszubauen, um damit eine rasche und weniger aufwendige Enterotoxin-Diagnostik der Lebensmitteluntersuchung zur Verfügung zu stellen.

5. Zusammenfassung

Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) wurde mittels Glutaraldehyd an Peroxidase (POD) gekoppelt, um es als enzymmarkiertes Antigen in einem kompetitiven ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) zum Nachweis von SEB einzusetzen. Anhand von gelchromatographischen und spektrophotometrischen Untersuchungen sowie mittels quantitativen serologischen Toxinnachweises (MANCINI-Test) konnte gezeigt werden, daß eine Kopplung von POD und SEB im molaren Verhältnis von 1:1 möglich ist. Für den POD-Nachweis erwies sich ein Substrat am geeignetsten, das o-Dianisidin als Chromogen enthielt.

Das Immunosorbens wurde durch Inkubation von Polystyrenröhrchen mit anti-SEB-haltigem γ -Globulin (in PBS) im Wasserbad (3 Std., 37°C) hergestellt. Die γ -Globulin-Lösung muß im Hinblick auf den ELISA einen überwiegenden Anteil an spezifischen Antikörpern enthalten, da die Bindungskapazität von Polystyren für Protein limitiert ist und somit bei zu großem Angebot an unspezifischem Protein die Empfindlichkeit des ELISA vermindert wird. Als bakterizide (konservierende) Substanz für die verschiedenen Lösungen zur Herstellung des Immunosorbens eignete sich NaN_3 (0,02%).

Der ELISA wurde aus Zeitersparnisgründen bevorzugt im kompetitiven System bei gleichzeitiger Inkubation von enzymmarkiertem SEB und freiem SEB durchgeführt. Der Grad der Bindungshemmung von enzymmarkiertem SEB wurde anhand von SEB-Standards ermittelt. Graphisch läßt sich die Reaktion in einer typischen sigmoiden Kurve darstellen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten war die Bindung des Antigens nahezu abgeschlossen.

Das Testsystem wurde so abgestimmt, daß die spezifischen Antikörper limitiert waren und enzymmarkiertes Antigen in geringem Überschuß vorhanden war.

Der ELISA zeigte eine hohe Nachweisempfindlichkeit für SEB (durchschnittlich 0,1 ng/ml gegenüber der höchsten Empfindlichkeit von 0,1 µg/ml im OUCHTERLONY-Test) und erforderte deshalb für die Herstellung des Immunosorbens homologes Antiserum. Aufgrund dieser hohen Sensitivität war es möglich, auch noch sehr schwache Kreuzreaktionen eines Antiserums mit heterologen SE-Typen festzustellen, was zuvor im OUCHTERLONY-Test nicht erfaßbar gewesen war. Die geringfügige konzentrationsunabhängige Bindungshemmung (6%) durch Protein A - aufgrund der Reaktion mit dem Fc-Teil des Kaninchen-Immunglobulins - störte den quantitativen SEB-Nachweis nicht. Dies gilt jedoch nicht für Immuns serum, das spezifische Bindungsstellen für Protein A besitzt.

Der ELISA eignete sich sowohl zum sensitiven Nachweis von SEB in gereinigten (REISER-Extraktion) als auch in nur durch Säurefällung und Chloroformextraktion hergestellten Lebensmittelextrakten. Durch Modifikation des verkürzten Extraktionsverfahrens ist noch eine Steigerung der Rückgewinnung des Toxins wahrscheinlich.

Summary

Staphylococcal enterotoxin B (SEB) had been coupled with glutaraldehyde to peroxidase (POD) to get an enzyme-linked antigen for the detection of SEB in a competitive ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). By gelchromatography, spectrophotometry, and serological quantitative toxin detection (MANCINI-test) it could be shown, that coupling of POD and SEB is possible in a molar ratio of 1:1. For POD-detection a substrate containing o-dianisidine as chromogen proved to be most suitable.

The immunosorbent was prepared by incubating polystyrene tubes with anti-SEB containing γ -globulin (in PBS) in a water bath (3 hr at 37°C). With regard to the ELISA the specific antibodies in the γ -globulin solution had to prevail, because the adsorption capacity of polystyrene for protein is limited. As preservative NaN_3 (0.02%) suited for the different solutions was used to prepare the immunosorbent.

In order to save time the ELISA was preferably run in a competitive system incubating enzyme-linked and unlabelled SEB in one step. The amount of binding competition on enzyme-labelled SEB was calculated using SEB-standards. These results are represented in typical sigmoide graphs. After an incubation time of 30 minutes the binding of antigen to the immunosorbent was nearly finished.

The test-system was coordinated by limiting specific antibodies and using enzyme-linked antigen in small excess.

The ELISA showed high sensitivity in SEB-detection (on an average 0,1 ng/ml compared with the highest sensitivity of 0,1 $\mu\text{g/ml}$ for

the OUCHTERLONY-test) and required therefore homologous antiserum for the preparation of the immunosorbent. On account of this high sensitivity it was possible to detect even very weak cross-reactions between one SEB-antiserum and heterologous SE-types, that were not found in the OUCHTERLONY-test before. The insignificant, concentration independent binding competition (6%) by protein A - because of the reaction with the Fc-part of rabbit immunoglobulin - did not affect the quantitative SEB-detection. This, however, cannot be applied to immunoserum that contains specific binding-sites for protein A.

The ELISA proved to be a sensitive method for SEB-detection in purified food extracts (REISER-method) as well as in extracts prepared only by acid precipitation and chloroform-extraction (shortened method). It seems to be possible to increase the toxin-recovery by modifying the shortened extraction method.

6. Literaturverzeichnis

1. ANGELOTTI, R. (1969):
Staphylococcal intoxications.
in: RIEMANN, H.: Food-borne infections and intoxications.
1. Aufl., Academic Press, New York und London, 359 - 393.
2. AVRAMEAS, S. (1972):
Enzyme markers: their linkage with protein and use in
immunohistochemistry.
Histochem J. 4, 321 - 330.
3. AVRAMEAS, S. und T. TERNYNCK (1971):
Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced
intracellular penetration.
Immunochimistry 8, 1175 - 1179.
4. AVRAMEAS, S. und B. GUILBERT (1972):
Enzyme-immunoassay for the measurement of antigens using
peroxidase conjugates.
Biochimie - Extrait du Tome 54, 837 - 842.
5. BENNETT, R.W. (1971):
Persönliche Mitteilung.
6. BERGDOLL, M.S. (1956):
The chemistry of staphylococcal enterotoxin.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 65, 139 - 143.
7. DERSELBE (1970):
Enterotoxins.
in: MONTIE, T.C., S. KADIS und S.J. AJL (1970):
Microbial Toxins. Vol. III.
Academic Press, New York und London, 265 - 326.

8. DERSELBE (1972):
The enterotoxins.
in: COHEN, J.O. (1972): The Staphylococci.
Wiley-Interscience, New York, London, Sidney, Toronto, 301 - 331.
9. BERGDOLL, M.S. und R.N. ROBBINS (1973):
Characterization of types of staphylococcal enterotoxins.
J. Milk Food Technol. 36, 610 - 612.
10. BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):
Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.
J. Bact. 90, 1481 - 1485.
11. BERGDOLL, M.S., J.-Y. HUANG und E.J. SCHANTZ (1974):
Chemistry of the staphylococcal enterotoxins.
J. Agr. Food Chem. 22, 9 - 13.
12. BERGDOLL, M.S., H. SUGIYAMA und G.M. DACK (1959):
Staphylococcal enterotoxin. I. Purification.
Arch. Biochem. Biophys. 85, 62 - 69.
13. BERGDOLL, M.S., M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1959):
Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific
precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property.
J. Immunol. 83, 334 - 338.
14. BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971):
Identification of enterotoxin E.
Infect. Immun. 4, 593 - 595.
15. BERGDOLL, M.S., F.S. CHU, J.J. HUANG, C. ROWE und T. SHIH (1965):
Staphylococcal enterotoxin B. III. The physicochemical properties
and the N- and C-terminal amino acid sequences.
Arch. Biochem. Biophys. 112, 104 - 110.

16. BORJA, C.R. (1969):
Staphylococcal enterotoxin C. I. Phenolic hydroxyl ionization.
Biochemistry 8, 71 - 75.
17. BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1969):
Staphylococcal enterotoxin C. II. Some physical, immunological,
and toxic properties.
Biochemistry 8, 75 - 79.
18. BUKOVIC, J.A. und H.M. JOHNSON (1975):
Staphylococcal enterotoxin C: Solid-Phase Radioimmunoassay.
Appl. Microbiol. 30, 700 - 701.
19. CASMAN, E.P. (1960):
Further serological studies on staphylococcal enterotoxin.
J. Bact. 79, 849 - 856.
20. DERSELBE (1967):
Staphylococcal food poisoning.
Health Lab. Sci. 4, 199 - 206.
21. CASMAN, E.P., M.S. BERGDOLL und J. ROBINSON (1963):
Designation of staphylococcal enterotoxins.
J. Bact. 85, 715 - 716.
22. CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E. DORSEY und J.A. ISSA (1967):
Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, entero-
toxin D.
J. Bact. 94, 1875 - 1882.
23. CENTER FOR DISEASE CONTROL (1975):
Foodborne and waterborne disease outbreaks.
Annual Summary 1975, issued September 1976.

24. DASSELBE (1976):

Foodborne and waterborne disease outbreaks.
Annual Summary 1976, issued October 1977.

25. CHANG, P.-C. und N. DICKIE (1971):

Fractionation of staphylococcal enterotoxin B by isoelectric focusing.
Biochem. Biophys. Acta 236, 367 - 375.

26. CHANG, P.-C., N. DICKIE und F.S. THATCHER (1971):

Hydroxyl apatite column chromatography of enterotoxin B.
Can. J. Microbiol. 17, 296 - 297.

27. CHU, F.S. (1968):

Hydrogen ion equilibria of staphylococcal enterotoxin B.
J. Biol. Chem. 243, 4342 - 4349.

28. CHU, F.S. und M.S. BERGDOLL (1969):

Studies on the chemical modification of staphylococcal enterotoxin B. 1. Alkylation and oxidation of methionine residues.
Biochim. Biophys. Acta 194, 279 - 286.

29. CHU, F.S. und C. CRARY (1969):

Studies on the chemical modification of staphylococcal enterotoxin B. II. Carboxyl residues.
Biochim. Biophys. Acta 194, 287 - 292.

30. COLLINS, W.S., J.F. METZGER und A.D. JOHNSON (1972):

A rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin.
J. Immunol. 108, 852 - 856.

31. COLLINS, W.S., A.D. JOHNSON, J.F. METZGER und R.W. BENNETT (1973):
Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A.
Appl. Microbiol. 25, 774 - 777.
32. DANGERFIELD, H.G. (1973):
Effect of enterotoxins after ingestion by humans.
Vortrag, Annual Meeting American Soc. for Microbiology.
33. DICKIE, N., Y. YANO, C.E. PARK, H. ROBERN und S. STAVRIC (1973):
Solid-phase radioimmunoassay of staphylococcal enterotoxins in food.
in: K. OSTOVAR (ed.) Proceedings: Staphylococci in food conference, 188 - 204.
Pennsylvania State University, State College, Pa.
34. DONELLY, C.B., J.E. LESLIE, L.A. BLACK und K.H. LEWIS (1967):
Serological identification of enterotoxinogenic staphylococci from cheese.
Appl. Microbiol. 15, 1382 - 1387.
35. ENGVALL, E. und P. PERLMANN (1971):
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 8, 871 - 874.
36. DIESELBEN (1972):
Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.
J. Immunology 109, 129 - 135.

37. ENGVALL, E., K. JONSSON und P. PERLMANN (1971):
Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of
protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled
antigen and antibody-coated tubes.
Biochim. Biophys. Acta 251, 427 - 434.
38. FELDMANN, G., P. DRUET, J. BIGNON und S. AVRAMEAS (1975):
Immunoenzymatic techniques.
Proceedings of the first international symposium on immuno-
enzymatic techniques, Paris, 1975.
North-Holland Publishing Company, Amsterdam - Oxford.
American Elsevier Publishing Company, Inc., New York.
39. FEY, H. (1977):
Persönliche Mitteilung.
40. DERSELBE (1978):
Persönliche Mitteilung.
41. DERSELBE (1978):
Staphylokokken-Enterotoxine in Lebensmitteln und deren Nachweis.
Chem. Rundschau 31, 6 - 9.
42. FEY, H. und G. STIFFLER-ROSENBERG (1977):
Detection of staphylococcal enterotoxin B with a new
modification of the enzyme linked immunoassay (ELISA).
Experientia 33, 1678.
43. FORSGREN, A. (1970):
Significance of protein A production by staphylococci.
Infect. and Immun. 2, 672 - 673.
44. FORSGREN, A., U. FORSUM und H.O. HÅLLANDER (1972):
Failure to detect all-associated enterotoxin B in
staphylococcus aureus by immunofluorescence.
Appl. Microbiol. 23, 559 - 564.

45. FRANEK, F. und L. SIMEK (1971):
The antibody response of pigs to dinitrophenylated bovine JgG administered with a novel type of adjuvant.
Europ. J. of Immunol. 1, 300.
46. GANTZE, K. (1976):
Zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen in Lebensmitteln mittels Froschspermatest und dem vorgeschalteten Extraktionsverfahren.
Vet. med. Diss., München.
47. GASPER, E. (1973):
Detection of staphylococcal enterotoxin by LAURELL electro-immunodiffusion.
Oregon State University, Ph.D., Microbiology.
48. GENIGEORGIS, C. und J.K. KUO (1976):
Recovery of staphylococcal enterotoxin from foods by affinity chromatography.
Appl. and Environ. Microbiol. 31, 274 - 279.
49. HIBNICK, H.E. und M.S. BERGDOLL (1959):
Staphylococcal enterotoxin. II. Chemistry.
Arch. Biochem. Biophys. 85, 70 - 73.
50. HOLBROOK, R. und A.C. BAIRD-PARKER (1975):
Serological methods for the assay of staphylococcal enterotoxins.
Society for Appl. Bacteriology, Techn. Series 8, 108 - 128.
Academic Press, London, New York und San Francisco.
51. HUANG, J.-Y. und M.S. BERGDOLL (1970):
The primary structure of staphylococcal enterotoxin B.
I. Isolation, composition, and sequence of tryptic peptides from oxidized enterotoxin B.
J. Biol. Chem. 245, 3493 - 3510.

52. DIESELBEN (1970):

The primary structure of staphylococcal enterotoxin B.
II. Isolation, composition, and sequence of chymotryptic peptides from oxidized enterotoxin B.
J. Biol. Chem. 245, 3511 - 3517.

53. DIESELBEN (1970):

The primary structure of staphylococcal enterotoxin B.
III. The cyanogen bromide peptides of reduced and amino-ethylated enterotoxin B and the complete amino acid sequence.
J. Biol. Chem. 245, 3518 - 3525.

54. HUANG, J.-Y., E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1975):

The amino acid sequence of the staphylococcal enterotoxins.
Jap. J. Med. Sci. Biol. 28, 73 - 75.

55. JOHNSON, H.M., J.A. BUKOVIC und P.E. KAUFFMAN (1973):

Staphylococcal enterotoxins A and B: solid-phase radio-immunoassay in food.
Appl. Microbiol. 26, 309 - 313.

56. JOHNSON, H.M., J.A. BUKOVIC, P.E. KAUFFMAN und J.T. PEELER (1971):

Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay.
Appl. Microbiol. 22, 837 - 841.

57. LIND, J. (1975):

The interaction between staphylococcal protein A and IgM.
in: Staphylococci and Staphylococcal Diseases.
JELJASZEWICZ (ed.), Gustav-Fischer-Verlag, Stuttgart.

58. LINDROTH, S. und A. NISKANEN (1977):

Double antibody solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A.
Europ. J. Appl. Microbiol. 4, 137 - 143.

59. MAYER, S. (1975):
Enterotoxinbildungsvermögen boviner und humaner Staphylokokken unter Berücksichtigung der Antibiotikaresistenz und anderer biologischer Eigenschaften.
Vet. med. Diss., München.
60. MINOR, T.E. und E.H. MARTH (1976):
Staphylococci and their significance in foods.
Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Oxford - New York, 1976.
61. NAKANE, P.K. und A. KAWAOI (1974):
Peroxidase-labelled antibody, a new method of conjugation.
J. Histochem. and Cytochem. 22, 1084 - 1091.
62. NISKANEN, A. und S. LINDROTH (1976):
Comparison of different purification procedures for extraction of staphylococcal enterotoxin A from foods.
Appl. Eur. Microbiol. 32, 455 - 464.
63. NIYOMVIT, N., K.E. STEVENSON und R.F. McFEETERS (1978):
Detection of staphylococcal enterotoxin B by affinity radio-immunoassay.
J. Food Sci. 43, 735 - 739.
64. OEDING, P. und A. GROV (1972):
Cellular antigens.
in: J.O. COHEN (ed.): The staphylococci.
Wiley-Interscience, New York.
65. ORTH, D.S. (1977):
Statistical analysis and quality control in radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxins A, B and C.
Appl. and Environ. Microbiol. 34, 710 - 714.

66. PESCE, A.J., R.R. MODESTO, D.J. FORD, K. SETHI, D.H. CLYNE und V.E. POLLAK (1976):
Preparation and analysis of peroxidase antibody and alkaline phosphatase antibody conjugates.
in: FELDMAN et al. (eds.): Immunoenzymatic Techniques,
North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
67. POBER, Z. und G.J. SILVERMAN (1976):
Modified radioimmunoassay determination for staphylococcal enterotoxin B in foods.
Appl. and Environ. Microbiol. 33, 620 - 625.
68. REISER, R., D. CONAWAY und M.S. BERGDOLL (1974):
Detection of staphylococcal enterotoxin in foods.
Appl. Microbiol. 27, 83 - 85.
69. RICHTER, B. (1974):
Zur Produktion von Staphylokokkenenterotoxin B in verschiedenen Nährmedien.
Vet. med. Diss., München.
70. RUITENBERG, E.J., P.A. STEERENBERG und B.J.M. BROSI (1975):
Micro-system for the application of ELISA in the serodiagnosis diagnosis of *Trichinella spiralis* infections.
Medikon Nederland 4, 30 - 31.
71. SAUNDERS, G.C. (1975):
Serologic testing with enzyme-labelled antibodies (ELA).
Proceedings of 17th Annual Meeting, American Association of
Vet. Laboratory Diagnosticians, Roanoke/Virginia,
Oct. 13 - 15, 311 - 320.
72. SAUNDERS, G.C. und CLINARD (1976):
Rapid micromethod of screening for antibodies to disease agents using the indirect enzyme-labelled antibody test.
J. of Clin. Microbiol. 3, 604 - 608.

73. SAUNDERS, G.C. und M.L. BARTLETT (1977):
Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the
detection of staphylococcal enterotoxin A.
Appl. and Environ. Microbiol. 14, 518 - 522.
74. SAUNDERS, G.C. und M.E. WILDER (1974):
Disease screening with enzyme-labelled antibodies.
J. of Infect. Dis. 129, 362 - 364.
75. SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO, D.A. DUNNERY
und M.S. BERGDOLL (1965):
Purification of staphylococcal enterotoxin B.
Biochemistry 4, 1011 - 1016.
76. SCHUURS, A.H.W.M. und B.K. VAN WEEMEN (1977):
Review: Enzyme immunoassay.
Clinica Chimica Acta 81, 1 - 40.
Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
77. SIMON, E. und G. TERPLAN (1977):
Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxin B mittels ELISA-Test.
Zbl. Vet. Med. B 24, 842 - 844.
78. SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):
Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.
Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128 - 137.
79. SPERO, L., J.F. METZGER, J.R. WARREN und B.Y. GRIFFIN (1975):
Biological activity and complementation of the two peptides
of staphylococcal enterotoxin B formed by limited tryptic
hydrolysis.
J. Biol. Chem. 250, 5026 - 5032.

80. SURGALLA, M.J., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1953):
Some observations on the assay of staphylococcal enterotoxin
by monkey-feeding test.
J. Lab. Clin. Med. 41, 782 - 788.
81. TERPLAN, G. und E. SIMON (1976):
Detection of staphylococcal enterotoxin in foods with regard
to ultrafiltration and precipitation methods.
Vortrag, National Research Center, Cairo, October 1976.
82. UNTERMANN, F. (1972):
Diagnostik der Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung.
Fleischwirtschaft 52, 500 - 503.
83. UNTERMANN, F. und H.-J. SINELL (1970):
Beitrag zum Vorkommen enterotoxinbildender Staphylokokken.
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 215, 166 - 172.
84. WARREN, J.R., L. SPERO und J.F. METZGER (1973):
Antigenicity of formaldehyde-inactivated staphylococcal
enterotoxin B.
J. Immunol. 111, 885 - 892.
85. WEBER, K. und M. OSBORN (1969):
The reliability of molecular weight determination by
dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis.
J. of Biol. Chem. 244, 4406 - 4412.
86. WEEMEN, B.K. van und A.H.W.M. SCHUURS (1972):
Immunoassay using hapten-enzyme conjugates.
FEBS Letters 24, 77 - 81.
87. ROBEARN, H., M. DIGHTON, Y. YANO und N. DICKIE (1975):
Double-antibody radioimmunoassay for staphylococcal
enterotoxin C₂.
Appl. Microbiol. 30, 525 - 529.

Abschließend danke ich Herrn Professor Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Ebenso möchte ich mich auch bei Frau Daffner für das Schreiben dieser Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Am 29. Januar 1949 wurde ich, Elisabeth Simon, geb. Brockmann, als zweites Kind des Landwirts Wilhelm Brockmann und seiner Ehefrau Anna in Wesseloh (Niedersachsen) geboren.

Ostern 1955 wurde ich in die Volksschule Wesseloh eingeschult und wechselte 1960 zur Mittelschule Schneverdingen, an der ich 1966 die Mittlere Reife erhielt. Anschließend besuchte ich die Niedersächsische Heimschule Helmstedt, ein mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium, und schloß dort 1969 mit dem Abitur ab.

Im Oktober 1969 nahm ich an der Tierärztlichen Hochschule Hannover das Studium der Tiermedizin auf. Nach bestandenem ersten Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung wechselte ich 1972 an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, an der ich das Studium im Mai 1975 erfolgreich beendete. Im Juli 1975 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.

Seit August 1975 bin ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Universität München tätig.

